



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/66717</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02878</p> <p>(22) 国際出願日 2000年5月1日(01.05.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/125169 1999年4月30日(30.04.99) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 松本 明(MATSUMOTO, Akira)[JP/JP] 〒547-0035 大阪府大阪市平野区西脇3丁目5番11号 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: HUMAN BRAIN CARBOXYPEPTIDASE B</p> <p>(54)発明の名称 ヒト脳カルボキシペプチダーゼB</p> <p>(57) Abstract A novel carboxypeptidase successfully identified by a screening from human hippocampus extract with the use as an indication of an activity of cleaving brain APP; and a gene encoding this protein. This protein and its gene are useful in, for example, preventing, treating, examining and diagnosing Alzheimer's disease, etc.</p> <p style="text-align: center;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

(57)要約

ヒト海馬抽出物から、脳 APP を切断する活性を指標にしたスクリーニングにより、新規なカルボキシペプチダーゼを同定することに成功した。さらに、このタンパク質をコードする遺伝子を単離した。該タンパク質やその遺伝子は、アルツハイマー病等の予防、治療、検査、診断などに有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

ヒト脳カルボキシペプチダーゼB

技術分野

本発明は、新規なカルボキシペプチダーゼおよびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

アルツハイマー病 (AD) は脳皮質に生じる神経変性疾患であり、疾患の進行に伴って徐々にニューロンが消失することから最終的には痴呆に至る。主な神経病理学的所見は、脳萎縮、老人斑、神経原線維集積物およびアミロイドアンギオパシーである。アルツハイマー病と脳の正常老化のいずれにおいても、ニューロンの喪失と、老人斑および脳血管性アミロイドの主要かつ必須な構成要素である $A\beta$ の異常沈着が空間的に特有な様式で出現し、この種の病変は記憶と認知にかかわる海馬や嗅内皮質 (enthorhinal cortex) といった大脳皮質の特定領域に主に認められる。数々の所見から、いくつかの種類の家族性アルツハイマー病や関連疾患の原因は $A\beta$ の内部や周囲に生じたミスセンス変異であることが示唆される (Chartier-Harlin, M. -C. et al. (1991) Nature, 353, 844-846; Haass, C. et al. (1995) Nature Med., 1, 1291-1296; Van-Broeckhoven, C. et al. (1990) Science, 248, 1120-1122)。別の種類の家族性アルツハイマー病の原因となる2つの遺伝子は、小胞体および/またはゴルジ複合体の内部で発現すると推定される類似した膜貫通タンパク質であるプレセニリン1および2をコードすることが同定されている (Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375: 754-760; Levy-Lahad, E. et al. (1995) Science 269: 970-977)。このようなタンパク質は、新たに合成された β -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) などのタンパ

ク質の修飾およびプロセッシングに関与すると思われる。脳内に認められる $A\beta$ ペプチドの中でも、 $A\beta$ 1-42 はアミロイド形成性が高く、神経細胞内での増加がアルツハイマー病の病態生理と直接関係している可能性がある (Hardy, J. (1995) Trends. Neurosci, 20, 154-159; Beyreuther, K. and Masters, C.L. (1997) Nature, 389, 677-678; Younkin, S.G. (1995) Ann. Neurol., 37, 287-288)。最近、 $A\beta$ 1-42 は小胞体で、 $A\beta$ 1-40 はトランスゴルジネットワークで産生されるというように、 $A\beta$ が産生される神経細胞内の特定の部位が同定されている (Hartmann, T. et al. (1997) Nature Med., 3, 1016-1020; Cook, D.G. et al. (1997) Nature Med., 3, 1021-1023)。以上の所見は、APP および $A\beta$ ペプチドの修飾、プロセッシングまたは輸送における何らかの障害が、アルツハイマー病の病態生理に本質的に関係していることを強く示唆する。稀な家族性アルツハイマー病の症例では原因遺伝子およびタンパク質がいくつか同定されているが、アルツハイマー病患者の大半 (95%を超える) は孤発性であり、疾患過程の原因となる遺伝子やタンパク質はまだ同定されていない。個々のアルツハイマー病患者の主な原因が何であれ、アルツハイマー病の進行は脳内 $A\beta$ の蓄積および凝集をもたらし、それは最終的にはおそらく Ca^{2+} イオンチャネルの形成、ミクログリアによるフリーラジカルの生成および/またはアポトーシス機構を介して神経死を誘発する (Loo, D.T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7951-7955; Arispe, N. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 567-571)。

$A\beta$ 分子種が生成されるタンパク質分解過程は未だ明らかになっていない。 α 、 β または γ -セクレターゼ活性を有するプロテアーゼの候補は種々の種および臓器から同定されているが、その大半は合成基質を用いた活性のアッセイによって調製されたものであり、このような候補プロテアーゼの中で天然型 APP 基質に対する活性を持つものはわずかに過ぎない。家族性アルツハイマー病の原因となる同定された遺伝子のいずれかをトランスジェニックマウスで誘導させ、ヒト脳内

で認められる神経病理学的所見を得ようとの試みは成功していない。線維状 A β のマイクロインジェクションを行ったサル脳に関する最近の所見からは、特に高等霊長類では、A β の in vivo 神経毒性が加齢脳で一種の病理反応を起こすことが示唆されている (Geula, C. et al.(1998) Nature Med., 4, 827-831)。以上の所見から、A β および A β 含有ペプチドが、種および組織に特異的な様式で生成されることが示唆されるが、その分子メカニズムは明らかにされていない。

発明の開示

本発明は、脳で発現し、脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する新規なカルボキシペプチダーゼ、およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

本発明者らは以前、家族性アルツハイマー病患者に由来するリンパ芽球細胞における APP および A β 含有ペプチドのプロセッシングを解析した (Matsumoto, A. and Fujiwara, Y. (1993) Eur. J. Biochem., 217, 21-27; Matsumoto, A. and Matsumoto, R. (1994) Eur. J. Biochem., 225, 1055-1062)。家族性アルツハイマー病細胞の培地には、合成基質に対する β -セクレターゼ様活性を示す 68kDa のセリンプロテアーゼが認められた (Matsumoto, A. and Fujiwara, Y. (1994)

Biochemistry, 33, 3941-3948)。このプロテアーゼは、リンパ芽球細胞 (LAP P) から調製した天然型 APP およびその A β 含有断片を、A β -N 末端の近傍部位で切断した (Matsumoto, A. et al.(1995) Neurosci. Lett., 195, 171-174)。

しかし、このセリンプロテアーゼの活性を、正常ヒト脳から調製した天然型脳 APP を基質に用いて測定したところ、該プロテアーゼは天然型脳 APP を分解しないことが判明した。このことから本発明者らは、基質としての天然型 APP には組織特異性があり、脳において発現しているプロテアーゼを、天然型脳 APP の切断活性を指標に検索することで、天然型脳 APP を基質とする新規なプロテアーゼを同定できるはずだと考えた。

そこで、本発明者らは、ヒト海馬のホモジネート分画物を天然型脳 APP のタンパク質分解活性に関して検索し、活性画分を分析することにより、脳 APP を複数の部位で切断して A β 含有ペプチドを生成する活性を有する 40kDa のタンパク質を分離することに成功した。このタンパク質を解析したところ、カルボキシペプチダーゼ (CP) ファミリーに属する新規プロテアーゼであることが判明した。このプロテアーゼ (脳カルボキシペプチダーゼ B; 脳 CPB) は血漿 CPB が選択的スプライシングを受けたアイソフォームではなく、C 末端 14 アミノ酸などの特定の特徴を有していた。ヒト脳 CPB cDNA プロンプを用いたノーザン解析およびヒト脳 CPB 特異的抗体を用いたウェスタン解析から、このプロテアーゼが脳特異的に発現していることが判明した。免疫組織化学試験では、このプロテアーゼが正常脳の神経細胞体、特に海馬錐体ニューロンと上衣 - 脈絡叢細胞、およびミクログリアの内部で発現されていることが示された。また、髄液および血液中にも微量ながら存在していた。孤発性アルツハイマー病患者の脳では、神経における発現の低下と、細胞外沈着を伴うプロテアーゼ免疫反応性のミクログリアのクラスターが検出された。さらに、抗 A β N 端抗体を利用したウェスタン解析から、ヒト脳 CPB が、A β ペプチドをその C 末端から分解するエキソペプチダーゼ活性を有することが判明した。

以上の所見は、本発明者等により単離された脳 CPB が APP プロセッシングにおいて生理的機能を果たしており、アルツハイマー病の病態生理にも重要であることを示唆している。従って、本発明者等により単離された脳 CPB は、それ自体アルツハイマー病の予防、治療のための薬剤として、また、該予防や治療のための薬剤のスクリーニングへの利用が可能である。さらに本発明者等により単離された脳 CPB は、アルツハイマー病の検査への利用も可能である。

また、本発明者等により単離された脳 CPB やその活性を調節する化合物は、上記したアルツハイマー病に限られず、広く A β の蓄積を生じる疾患の予防、治療、診断への応用が可能であると考えられる。

従って、本発明は、

(1) 配列番号：2 から 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(2) 脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有するタンパク質であって、下記

(a) または (b) より選択されるタンパク質、

(a) 配列番号：2 から 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質、

(3) (1) または (2) に記載のタンパク質をコードする DNA、

(4) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む、(3) に記載の DNA、

(5) (3) または (4) に記載の DNA が挿入されたベクター、

(6) (5) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(7) (6) に記載の宿主細胞を培養し、該細胞内で発現した組み換えタンパク質を該細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、(1) または (2) に記載のタンパク質の製造方法、

(8) (1) または (2) に記載のタンパク質に対する抗体、

(9) (1) または (2) に記載のタンパク質の部分ペプチド、

(10) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド、

(11) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(12) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合する化合物、

(13) (11) に記載の方法により単離されうる、(12) に記載の化合物、

(14) (1) または (2) に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、(1) または (2) に記載のタンパク質にその基質を接触させる工程、

(b) 該基質の切断を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合(対照)比較して、(1) または (2) に記載のタンパク質により引き起こされる該基質の切断を増加または減少させる活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(15) 基質が脳 APP である、(14) に記載の方法、

(16) (1) または (2) に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する活性を有する化合物、

(17) (14) または (15) に記載の方法により単離されうる、(16) に記載の化合物、

(18) (1) または (2) に記載のタンパク質を有効成分とする、 $A\beta$ の生成調節剤、

(19) (1) または (2) に記載のタンパク質を有効成分とする、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の治療薬、

(20) 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、(19) に記載の治療薬、

(21) (12)、(13)、(16)または(17)に記載の化合物を有効成分とする、 $A\beta$ 生成調節剤、

(22) (12)、(13)、(16)または(17)に記載の化合物を有効成分とする、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の治療薬、

(23) 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、(22)に記載の治療薬、

(24) (1)または(2)に記載のタンパク質を含有することを特徴とする、該タンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット、

(25) (1)または(2)に記載のタンパク質の基質をさらに含む、(24)に記載のキット、

(26) 基質が脳APPである、(25)に記載の方法、

(27) 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の検査方法であって、

(a) 被検者から試料を調製する工程、

(b) 該試料に含まれる(1)または(2)に記載のタンパク質の量を(8)に記載の抗体を用いて検出する工程、を含む方法、

(28) 試料が髄液または血清である、(27)に記載の方法、

(29) 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、

(27)または(28)に記載の方法、

(30) (8)に記載の抗体を含む、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の検査薬、

(31) $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、(30)に記載の検査薬、を提供するものである。

本発明は、脳で発現し、脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する新規な脳カルボキシペプチダーゼ B (脳 CPB) タンパク質に関する。本発明のタンパク質に含まれるヒト脳 CPB タンパク質は、ヒト海馬の抽出物から、脳 APP の分解活性を指標にして単離された。また、ヒト脳 CPB タンパク質をコードする遺伝子は、ヒト脳 CPB タンパク質に対する抗体を用いた免疫学的スクリーニング、およびヒト脳 CPB タンパク質の部分アミノ酸配列を基に合成したプライマーを用いた RT-PCR および RACE によりクローニングされた。本発明者等により単離されたヒト脳 CPB をコードする cDNA の塩基配列を配列番号：1、該 cDNA によりコードされるヒト脳 CPB タンパク質 (プレプロ体) のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。本発明のヒト脳 CPB は、プレプロタンパク質として合成されたのち、シグナル配列が切り離されてプロタンパク質が生成し、さらに活性化ペプチドが切り離されて成熟体タンパク質が生成すると考えられる。本発明のヒト脳 CPB のプロタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3 に、成熟タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4 に示す。本発明において「脳 APP とは」、脳で発現する APP 分子種を指す。ヒト脳 APP の分子種としては、例えば、APP695 (Kang, J. et al. (1987) *Nature* 325, 733-736) や Appican (Shioi, J. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 13819-13822) が挙げられるが、これらに制限されない。

ヒト脳 CPB は、ヒト脳から調製された APP を複数の部位で切断して A β 含有ペプチドを生成する活性を有する。ヒト脳 CPB は、40kDa のプレプロタンパク質として合成され、そこから 30kDa の成熟タンパク質が生成すると考えられる。アミノ酸配列の特徴から、このタンパク質は、CPB ファミリーに属する新規プロテアーゼ (脳カルボキシペプチダーゼ B; 脳 CPB) であることが判明した。このプロテアーゼは、既知の CPB ファミリーに属するヒト血漿 CPB (HPCPB) と高い相同性を有していたが、特異的な C 末端 14 アミノ酸を有するなどの特定の特徴を有していたことから、血漿 CPB が選択的スプライシングを受けたアイソフォームではなく、独立の遺伝子であると推定された。

ヒト脳 CPB (HBCPB) は、ノーザン解析では、ヒト臓器のうち、脳のみで発現が認められた。また、ヒト脳 CPB の C 末端 14 アミノ酸に対する抗体 (抗 C14 抗体) は、神経細胞体および一部のミクログリアにおいてシグナルが検出されたが (図 7)、ヒト血漿 CPB (HPCPB) が合成される肝臓では検出されなかった。さらに、脳 mRNA の RT-PCR 解析では、プロセッシングを受けた形態のプレプロヒト脳 CPB に特有な 1077bp のバンドのみが検出された (図 4C)。さらに、抗プレプロヒト脳 CPB 抗体を用いて行った免疫学的スクリーニングでは、ほとんど同一の制限酵素パターンを有する 3 つの cDNA クローンが得られたが、このことはヒト脳 CPB がヒト脳で発現される唯一のカルボキシペプチダーゼ B アイソフォームであることを意味している。

正常脳に関する免疫組織化学分析では、ヒト脳 CPB が種々の神経細胞体、特に海馬錐体ニューロンと上衣-脈絡叢細胞、およびミクログリアの内部で発現されているが、アストロサイトでは発現されないことが示された。また、アルツハイマー病患者の脳では、ヒト脳 CPB はグリア浸潤を一部は含み、一部は含まない実質沈着としてミクログリアのクラスターの一部で検出された。また、5 例のアルツハイマー病患者の脳からの老人斑では、このプロテアーゼに対する免疫反応を示す呈色の一部に認められ、その頻度はそれぞれの脳のすべての斑のうち 10~60% の範囲であった。さらに、海馬実質では、ヒト脳 CPB および C14 に対する免疫反応性を示す円形で均質な沈着が 5 例のアルツハイマー病患者の脳のすべてに共通して認められ、これはアミロイド体とは明らかに異なっていた (図 9G)。

ミクログリア浸潤の亢進は、加齢脳およびアルツハイマー病患者の脳に共通する所見である。老人斑形成との関連からみたミクログリアの意義は明らかではないが、Wisniewski ら (Wisniewski, H.M. et al.(1989) Can. J. Neurol. Sci., 16, 535-542) は、 $A\beta$ 沈着の極めて近傍に位置する活性化ミクログリアの小胞体内に $A\beta$ 線維が存在することを報告しており、このことは活性化されたミクログリアが $A\beta$ ペプチドの合成とともにプロセッシングも行っていることを示唆する。

中胚葉に由来するミクログリア内の APP アイソフォームには LAPP、および Kunitz プロテアーゼ阻害性ドメインを有する APP があるが、これはいずれもニューロンでは発現されない。別の可能性としては、ミクログリアが初期の斑形成には関与せず、食細胞活動によって $A\beta$ ペプチドのプロセッシングを行うことも考えられる (Frackowiak, J. et al.(1992) Acta Neuropathol., 84, 225-233)。脈絡叢細胞は脳脊髄液 (CSF) を分泌し、上皮細胞は分泌、吸収および輸送の機能を果たして脳と CSF との間の障壁になると推測されている (Del Bigio, M.R. (1995) Glia, 14, 1-13)。これらの細胞内で上記抗 C14 抗体に対する免疫反応性が発現することから、APP の適切なアイソフォームのような脳細胞内で合成されるペプチドのプロセッシングにはヒト脳 CPB が必要なことが示唆される。生理的条件下でニューロン内の標的基質が CSF 中に放出される前にプロテアーゼと遭遇する機会は、神経細胞体および上皮細胞内の少なくとも 2 つ存在していると考えられる。アルツハイマー病では、ミクログリア活性化の亢進に加えて細胞外間質にヒト脳 CPB が存在することから病態生理学的異常を呈するものと考えられる。

また、 $A\beta$ ペプチドがヒト脳 CPB の基質であることが実験的に確認された。

以上のような所見から、本発明の脳 CPB タンパク質は、脳 APP の分解による $A\beta$ の生成およびアルツハイマー病の発症に深く関与していると考えられる。

すなわち、本発明の脳 CPB タンパク質を含むプロテアーゼの作用バランスの失調が、 $A\beta$ の異常蓄積をもたらしていることが示唆される。

本発明のヒト脳 CPB は、脳内に蓄積している自己凝集性の高い β アミロイドペプチド (特に β アミロイド 1-42) の代謝・低下作用により神経細胞死を減少させる機能をもち得る。

本発明の脳 CPB タンパク質は、 $A\beta$ の生成の分子メカニズムを解明する研究対象としての利用の他、それ自体医薬品として利用することができる。例えば、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中への持続注入し、髄液中でのヒト脳 CPB 濃度を上昇させることにより、上皮細胞を介して神経細胞への取り込みを促し、減

少・枯渇しているヒト脳 CPB を補い、 $A\beta$ 代謝を改善させることが可能であると考えられる。

また、本発明の脳 CPB は、医薬品として有用な本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングのためのツールとして利用することができる。さらに、本発明のタンパク質または本発明のタンパク質の活性を制御する化合物は、脳における $A\beta$ ペプチドの蓄積を来す病態を含む種々の疾患における予防や治療のための医薬として、また、それら疾患の検査や診断のための薬剤として有用である。このような疾患としては、例えば、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血（オランダ型等）、頭部打撲（ボクサー脳）などが挙げられる。

本発明においては、脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する限り、天然型ヒト脳 CPB タンパク質（配列番号：2、3、4）と構造的に類似したタンパク質も含まれる。このような構造的に類似したタンパク質には、天然型ヒト脳 CPB タンパク質の変異体や他の生物由来の脳 CPB タンパク質が含まれる。

このようなタンパク質は、当業者であれば、例えば、公知の変異導入法を用いて調製することができる。当業者に公知のタンパク質中のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel 法 (Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488; Kunkel, T.A. et al. (1987) Methods in Enzymology 154, 367)、Gapped duplex 法 (Kramer, W. et al. (1984) Nucl. Acids. Res. 12, 9441; Kramer, W. et al. (1987) Methods in Enzymology 154, 350)、Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA) 法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Methods in Enzymology 100, 468) などが挙げられる。タンパク質におけるアミノ酸の改変は、人為的に行うのであれば、通常、30 アミノ酸以内、好ましくは 10 アミノ酸以内、さらに好ましくは 5 アミノ酸以内である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このように脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する限り、人為的なまたは自然界におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿

入により天然型ヒト脳 CPB タンパク質（配列番号：2、3、4）に対してアミノ酸配列が異なるタンパク質も、本発明に含まれる。

置換されるアミノ酸は、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましいと考えられる。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp は、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln が挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、Asp および Glu が挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、His が挙げられる。

また、脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する、ヒト脳 CPB タンパク質と構造的に類似したタンパク質の調製は、公知のハイブリダイゼーション技術（2.9 Southern Blotting and Hybridization 2.9.1-2.9.10 (Selden, R.F.), 4.9 Analysis of RNA by Northern Hybridization 4.9.1-4.9.8 (Selden, R.F.), 6.3 Hybridization with Radioactive Probes Using DNA Fragments 6.3.1-6.3.6 (Straus, W.M.), 6.4 Hybridization with Radioactive Probes Using Oligonucleotides 6.4.1-6.4.5 (Duby, A.), in 'Current Protocols in Molecular Biology' (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. eds.) John Wiley & Sons, New York (1987)) やポリメラーゼ連鎖反応技術（Optimization of PCRs 3-12 (Innis, M.A. and Gelfand, D.H.), Amplification of Genomic DNA 13-20 (Saiki, R.K.), Amplification of RNA 21-27 (Kawasaki, E.S.), RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends 28-38 (Frohman, M.A.), Degenerate Primers for DNA Amplification 39-45 (Compton, T), cDNA Cloning Using Degenerate Primers 46-53 (Lee, C.C. and Caskey, T.), in 'PCR Protocols' (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. eds.) Academic Press, San Diego (1990)) を利用して行うことができる。即ち、当業者においては、「ヒト脳 CPB」cDNA 配列（配列番号：1）若しくはその一部をプローブとして、また、「ヒト脳 CPB」cDNA（配列番

号：1) に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、種々の他の生物から「ヒト脳 CPB」cDNA と相同性の高い DNA を単離し、さらに単離した DNA から「ヒト脳 CPB」タンパク質と構造的に類似したタンパク質を得ることが常套手段となっている。

本発明においては、脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する限り、「ヒト脳 CPB」cDNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質を包含する。このようなタンパク質を単離する他の生物としては、例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌなどが挙げられるが、これらに制限されない。このようなタンパク質をコードする cDNA を単離するには、例えば、これら生物の脳、例えば、海馬が材料として適していると考えられる。

ヒト以外の生物に由来する「脳 CPB」タンパク質をコードする DNA は、通常、「ヒト脳 CPB」と高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルで少なくとも 40%以上、好ましくは 55%以上、さらに好ましくは 70%以上（例えば、85%以上、90%以上、95%以上）の配列の同一性を指す。配列の相同性は、日本データバンク：DDBJ（国立遺伝学研究所）のホモロジーサーチプログラム、例えば FASTA、BLAST 等により決定することができる。

ヒト「脳 CPB」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。例えば ^{32}P ラベルしたプローブを用いて脳 cDNA ライブラリーから単離する場合の一例を示せば、ハイブリダイゼーション後の洗浄を、55°C、2×SSC、0.1%SDS の低ストリンジェントな条件で行う。より好ましくは、55°C、0.2×SSC、0.1%SDS の中程度のストリンジェントの条件で行う。さらに好ましくは 68°C、0.2×SSC、0.1%SDS の高ストリンジェントな条件で行う。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。他組織から単離する場

合には、類似の CPB が発現している可能性が考えられるため、高ストリンジェントな条件で洗浄を行うことが好ましい。

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、「脳 CPB」タンパク質が発現していると考えられる組織（例えば、海馬など）の抽出液に対し、後述する「脳 CPB」タンパク質に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。また、実施例に記載したように、ベンズアミジン-セファロースカラムに結合した画分を回収し、調製用 PAGE などを適宜組み合わせることによって調製することができる。一方、組換えタンパク質は、後述するように「脳 CPB」タンパク質をコードする DNA で形質転換した細胞を培養し、これらタンパク質を発現させ回収することにより調製することが可能である。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質のうち、活性化ペプチドと成熟タンパク質との境界部分を含むペプチドが挙げられる。このようなペプチドは、プロタンパク質から成熟タンパク質が切り出される反応を媒介するプロテアーゼに作用し、本発明のタンパク質の成熟体の生成と拮抗すると考えられる。また、本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、本発明のタンパク質の基質との結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、生体投与することで、本発明のタンパク質の阻害剤等としての利用が考えられる。これら部分ペプチドは、本発明のタンパク質を介したシグナル伝達の阻害剤や活性化剤として有用である。また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質（例えば、配列番号 2、3、4）の C 末端領域の部分ペプチドが挙げられ、該ペプチドは抗体の調製に利用することができる。また、本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、活性化ペプチドが挙げられる。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列を有する部分ポリペプチドは、少なくと

も7アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも9アミノ酸の鎖長を有すると考えられる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することがきでる。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードする DNA に関する。本発明のタンパク質をコードする DNA としては、これらタンパク質をコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノム DNA、および合成 DNA が含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。

本発明のタンパク質をコードする cDNA は、例えば、配列番号：1に記載の cDNA あるいはその断片、それらに相補的な RNA、または該 cDNA の配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを³²Pなどで標識し、本発明のタンパク質が発現している組織（例えば海馬など）由来の cDNA ライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これら cDNA の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば海馬など）由来の cDNA を鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノム DNA は、例えば、配列番号：1に記載の cDNA あるいはその断片、それらに相補的な RNA、または該 cDNA の配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを³²Pなどで標識し、ゲノム DNA ライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これら cDNA の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノム DNA を鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成 DNA は、例えば、配列番号：1に記載の cDNA の部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNA リガーゼで結合させることにより調製することができる。

これら DNA は、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、本発明のタンパク質は、それをコードする DNA（例えば、配列番号：1 に記載の DNA）を適当な発現ベクターに挿入し、当該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を該形質転換体またはその培養上清から生成することにより、組換えタンパク質として調製することが可能である。

例えば、大腸菌を宿主として組換えタンパク質を発現させる場合には、T7 RNA ポリメラーゼにより発現が誘導され、種々のタグを付加することが可能な pET System (Novagen 社)、本発明のタンパク質をセルロース結合ドメインとの融合タンパク質として発現させ、セルロース担体でアフィニティー精製することが可能な pET CBD Fusion System 34b-38b (Novagen 社)、本発明のタンパク質をグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現させ、グルタチオンセファロース 4B により精製することが可能な GST Gene Fusion System (Pharmacia 社) などを用いることができる。また、本発明のタンパク質を発現させるための宿主には制限はなく、公知のベクター系を用いて酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞などで発現させることが可能である。神経細胞（ニューロン）での発現の目的から、例えば、Semliki Forest Virus (SFV)ベクターを用いるシステム (Tienari, P.J. et al., EMBO J. 15: 5218-5229 (1996)等) を用いることができる。

宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、N 末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合タンパク質の形で発現させた場合には、ニッケルカラムやグルタチオンセファロースカラム等により精製することができる。また、本発明のタンパク質を融合タンパク質として発現させた場合には、その境界部位にスロンビン (Thrombin) や Factor Xa 等の切断部位を挿入しておくことにより、本発明のタンパク質部分を回収することが可能である。

本発明のタンパク質をコードする DNA またはそのアンチセンス DNA 等は、また、本発明のタンパク質の異常（発現異常や機能異常）に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。遺伝子治療に用いるためのベクターとしては、ベクターから治療上有効な発現が得られる限り制限はないが、例えば、アデノウイルスベクターやセムリキ森林ウイルスベクターが挙げられる（Chen, J. et al. (1998) Cancer Res. 58, 3504-3507; Barkats, M. et al. (1998) Progress in Neurobiology 55, 333-341）。

例えば、プレプロヒト脳 CPB-cDNA をセムリキ森林ウイルスベクター（pSFV-1）にフレームを合わせて組み込んだベクターを作成後、ヘルパーウイルスを用いて遺伝子組み換えウイルスを完成させ、全身状態やウイルス抗体値等により治療に適切な患者を選択し、該患者に対して遺伝子治療を行うことが考えられる。

本発明はまた、配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するポリヌクレオチドに関する。該ポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは本明細書において上記したストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードする DNA とのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなポリヌクレオチドには、本発明のタンパク質をコードする DNA 又は該 DNA と相補的な DNA と特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

本発明のタンパク質をコードする cDNA あるいはその配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードする遺伝子や cDNA のクローニング、あるいは PCR による増幅に利用できる。さらに、制限断片長多型（RFLP）、1

本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) などの方法により、遺伝子あるいは cDNA の多型あるいは異常の検出(遺伝子診断など)に利用できる。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明のタンパク質に対する抗体は、公知の方法により作製することが可能である (Scheidtmann, K.H., Immunological detection of known sequence, in "Protein structure", T.E. Creighton ed., IRL Press, Oxford University Press, pp. 93-115)。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、海馬組織より調製した天然由来の本発明のタンパク質または組換えタンパク質を、アジュバントと共に、ウサギ、モルモット、ヤギ等の動物に免疫する。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテイン A や固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。抗原として、本発明のタンパク質の部分ペプチドを用いることも可能である。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテイン A や固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。

これにより調製された抗体は、本発明のタンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常に起因す

る疾患の検査や診断、本発明のタンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。

実施例に示されたように、アルツハイマー病において、本発明のタンパク質の発現の低下、および間質への沈着が認められる。本発明のタンパク質は、髄液および血清中に検出されることから、これらの試料に含まれる本発明のタンパク質の検出により、脳において $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の検査・診断を行なうことが可能である。このような病態診断薬として、本発明のタンパク質に対する抗体は有用である。

本発明の抗体を用いる脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の検査は、(a) 被検者から試料を調製する工程、(b) 該試料に含まれる本発明のタンパク質の量を該タンパク質に対する抗体を用いて検出する工程、を含む方法により実施することができる。本発明の検査の対象となる疾患としては、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患であれば制限はなく、例えば、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲が挙げられる。検査のために被験者から調製する試料としては、髄液または血清が好適である。

試料中に含まれる本発明のタンパク質は、例えば、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法で検出することが可能である。検出に用いられる抗体としては、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体を検査薬として用いる場合、pH 緩衝液（例えばリン酸緩衝液、HEPES 緩衝液など）を用い、担体（例えば牛血清アルブミンまたはゼラチンなど）、防腐剤（アジ化ナトリウム）等を必要に応じて混合してもよい。

この検出の結果、健常者と比較して、被検者試料中の抗体反応性タンパク質量の増加もしくは減少、抗体反応性タンパク質の分子量の異常、および／または各分子量のタンパク質の量比の異常が認められれば、該被検者は、上記疾患にかかっているか、または上記疾患のおそれがある判定される。この検査は簡便であり

被検者への負担も少ないことから、CNS の病態を検査・診断するための優れた方法である。

また、本発明の抗体を抗体治療に用いることも考えられる。抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。このような抗体は、公知の方法により調製することができる (Parren, P.W. (1992) *Hum. Antibodies Hybridomas* 3, 137-145)。

本発明は、また、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング法は、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および (c) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。スクリーニングに用いる被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のタンパク質と結合するタンパク質のスクリーニングは、例えば、本発明のタンパク質の C 末端 14 アミノ酸 (C14) のオリゴペプチド等を固定したアフィニティーカラムに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングを実施することが可能である。また、本発明のタンパク質と結合するタンパク質やその遺伝子のスクリーニングは、例えば、ウェストウエスタンブロッティング法 (Tarassishin, L.A. and Russell, W.C. (1997) *Biochemistry (Mosc.)* 62, 38-40; Matthews, D.A. and Russell, W.C. (1998) *J. Ge*

n. Viol. 79, 1671-1675) や two ハイブリッドシステム (Vidal, M. (1997) The Reverse Two-Hybrid System in "The Yeast Two-Hybrid System" (Bartel, P. and Fields, S. eds.) Oxford University Press, New York; Fields, S. and Song, O.K. (1995) Microbiology Rev. 59, 94; Vidal, M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10321) を利用して行うことも可能である。コンビナトリアルケミストリー技術 (Myers, P.L. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 701-707; Campbell, D.B. (1997) Q. J. Nucl. Med. 41, 163-169) 等によるハイスループットを用いたスクリーニング (Cerretani, M. et al. (1999) Anal. Biochem. 266, 192-197; Kenny, B.A. et al. (1998) Prog. Drug. Res. 51, 245-269; Gonzalez, J.E. and Negulescu, P.A. (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9, 624-631) により本発明のタンパク質に結合する化合物を単離する方法も当業者に周知の技術である。

また、本発明は、本発明のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。この方法は、本発明のタンパク質によるその基質の切断活性を指標とする方法であり、具体的には、(a) 被検試料の存在下で、本発明のタンパク質にその基質を接触させる工程、(b) 該基質の切断を検出する工程、および (c) 被検試料非存在下において検出した場合 (対照) 比較して、本発明のタンパク質により引き起こされる該基質の切断を増加または減少させる活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法である。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、タンパク質、天然または合成ペプチド、天然化合物、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明のタンパク質との結合活性を指標とした上記のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。スクリーニングに用いる本発明のタンパク質としては、天然のタンパク質でも組換えタンパク質でもよい。

基質としては、脳 APP が好適である。天然型脳 APP は、実施例に記載の方法で調製することが可能である。また、本発明のタンパク質が切断活性を示しうる限り、脳 APP の部分ペプチドや、他の APP アイソフォームや APP 類似ポリペプチド、基質の切断部位を含むように合成されたオリゴペプチドを用いてもよい。

基質の切断は、例えば基質と本発明のタンパク質をインキュベート後、SDS-PAGE を行い、基質に対する抗体を用いたウェスタンブロットティングにより検出することが可能である。または、基質として合成オリゴペプチドを用いる場合は、あらかじめ N 端または C 端等を標識しておき、Tris-tricine 型 PAGE または薄層クロマトグラフィー (TLC) などにより検出することもできる。または、基質ペプチドの一端をマイクロプレート等の支持体に固定化し、他端を標識しておけば、基質の切断をより簡便に検出することが可能である。

被検試料非存在下と比較して、被検試料存在下において、本発明のタンパク質による基質の切断が促進されれば、その化合物は、本発明のタンパク質による基質の切断活性を促進する化合物と判定される。逆に被検試料存在下において、本発明のタンパク質による基質の切断が阻害されれば、その化合物は、本発明のタンパク質による基質の切断活性を阻害する化合物と判定される。本発明において「基質の切断活性を阻害する」とは、切断活性を完全に阻害する場合および部分的に阻害する場合を含む。

なお、本発明のタンパク質による基質の切断部位を決定するには、例えば、まず、本発明のタンパク質と脳 APP とをインキュベートし、切断された脳 APP を SDS-PAGE で分離後、APP のドメイン特異的抗体(例えば A β については A β 1-17 抗体、A β 17-24 抗体、A β 1-40 C 端抗体、A β 1-42 C 端抗体等)を用いてウェスタンブロットティングを行い、切断部位を推定する。次に、よりスケールアップした系で本発明のタンパク質により切断された基質断片を精製し、N 端または C 端のアミノ酸シーケンシングを行うことにより、切断部位を同定することができる。または、基質として合成オリゴペプチド(例えば A β 1-42 等)を用い、本発明の

タンパク質とインキュベート後、C 端から分解された遊離アミノ酸をアミノ酸分析器により定性・定量的に測定し、切断部位を推定することができる。

本発明のタンパク質や本発明のスクリーニング方法により単離される化合物は、例えば、 $A\beta$ の生成を調節するための薬剤として、また、本発明のタンパク質が関与する脳疾患（例えば、アルツハイマー病などの $A\beta$ の蓄積を生じる疾患）の予防薬や治療薬への応用が考えられる。

本発明のタンパク質や本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質を含有することを特徴とする、該タンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キットに関する。本発明のキットにおける本発明のタンパク質は、例えば、精製または粗精製タンパク質、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞外に発現した形態、または支持体に結合した形態であってもよい。本発明のキットの他の要素としては、上記タンパク質標品以外に基質を含むことが好ましい。基質としては、本発明のタンパク質が切断活性を示し

うる限り制限はないが、脳 APP が好適である。天然型脳 APP は、実施例に記載の方法で調製することが可能である。また、脳 APP の部分ペプチドや、他の APP アイソフォームや APP 類似ポリペプチド、基質の切断部位を含むように合成されたオリゴペプチドを基質として含んでもよい。基質は標識されていてもよい。さらに、本発明のタンパク質と基質との反応のための緩衝液、洗浄液、基質の切断を検出するための試薬などが含まれていてもよい。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト海馬ホモジネートの APP 分解活性を示す写真である。(A)ベンズアミジン-セファロース 6B アフィニティカラムと結合した画分の未変性 PAGE プロフィール。クーマシーブリリアントブルー染色。左：分子量マーカーの移動位置をキロダルトン単位で示したもの。220kDa：ミオシン、97kDa：ホスホリラーゼ b、67kDa：ウシ血清アルブミン、46kDa：卵白アルブミン、30kDa：脱炭酸酵素、21kDa：トリプシン阻害因子。(B)調製用未変性 PAGE によって分画したタンパク質の SDS-PAGE 解析。平行ウェルには 3 つの連続した画分のうち 1 つずつを並べて泳動し、分離した後に銀染色によって可視化した。(C)未変性 PAGE によって分離した画分 19 の Mono S イオン交換クロマトグラフィー。縦軸：280nm での光学濃度 (OD)。横軸：画分を ml 単位で示したもの。矢印は溶出緩衝液を加えた画分の位置を示す。

図 2 は、精製した 40kDa タンパク質の脳 APP 分解活性を示す写真である。約 0.1pmol の天然型 APP (レーン 3 を除く) またはコンドロイチナーゼ ABC (CDR-ABC) で前処理した APP (レーン 3) を、1mM EDTA (レーン 2) または 1mM ジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子 (CPI) (レーン 4) の存在下または非存在下で、40kDa プロテアーゼ (レーン 2、3、4、6、7、8、9 および 10 では約 0.05 pmol、レーン 5 では約 0.01pmol) で処理した。また抗 40kDa プロテアーゼ抗体 (レーン 9) あるいは抗 C14 抗体 (レーン 10) に共存下 (容量比で 1/50) でも

解析した。Tris-トリシン SDS-PAGE の後、レーン 1 から 6 までに対応するプロットには抗 A β 1/14 抗体、レーン 7 および 10 に対応するプロットには抗 APP-CT 抗体を用いて解析した。左：分子量マーカーの移動位置をキロドルトン単位で示したもの。46kDa：卵白アルブミン、21kDa：トリプシン阻害因子、14kDa： α -ラクトアルブミン、6.5kDa：ミオグロビン II、3.4kDa：ミオグロビン I。矢印は 5.5 kDa の A β ペプチドの移動位置を示す。

図 3 は、プレプロヒト脳 CPB cDNA の塩基配列および予想されるアミノ酸配列。左の数字は cDNA のヌクレオチド残基を示し、右の数字は予想されるアミノ酸残基を示す。矢尻は疎水性シグナル (22 アミノ酸残基) の切断部位、および活性化ペプチド (92 アミノ酸残基) がプレプロ酵素から放出されると予想される切断部位を示す。30kDa タンパク質 (成熟型酵素) 中に同定されたアミノ酸配列には下線を施した。停止コドンおよびボリアデニル化シグナルには二重下線を施した。N 結合グリコシル化部位はアスパラギン残基の下に●印を付した。組織 CPB および HPCPB に関して、亜鉛結合にかかわると予想されるアミノ酸残基 (円で囲んだアミノ酸残基) および基質結合にかかわると予想されるアミノ酸残基 (四角で囲んだアミノ酸残基) を示した。以上の配列データは DDBJ/EMBL/GenBank データベースにアクセッション番号 AB011969 として寄託されている。

図 4 は、プレプロヒト脳 CPB の分子的特徴の決定。(A)プレプロヒト脳 CPB およびプレプロ HPCPB の構造を比較した模式図。(B)ヒト脳 CPB に特有な C 末端 14 アミノ酸残基をコンピューター検索による相同ペプチドとともに併置したもの。同一のアミノ酸を囲って示した。(C)ヒト脳 CPB に関するヒト海馬 RNA の RT-PCR 解析を示す写真。DNA 分子量マーカーの移動位置を bp 単位で示した。矢尻は合成ヒト脳 CPB cDNA (左) の 1077bp バンドおよびヒト脳 CPB cDNA の 3' 末端部分に対応する 538bp バンド (右) の移動位置を示す。

図 5 は、種々の臓器由来のヒト mRNA のノーザンプロット解析を示す写真である。ヒト脳 (海馬) (レーン 1)、心臓 (レーン 2)、胎盤 (レーン 3)、脾臓

(レーン 4)、腎臓 (レーン 5)、肝臓 (レーン 6) および脾臓 (レーン 7) 由来の全 RNA 20 μ g から調製したポリ(A)⁺RNA を、2 回に分けて (A および B) 変性アガロースゲルに並べて泳動した。(A)³²P で標識したプレプロヒト脳 CPB cDNA の 538bp 断片をプローブに用いたオートラジオグラム。(B)³²P で標識した β -アクチン cDNA プローブを用いたオートラジオグラム。左: RNA 分子量マーカーの移動位置を kb 単位で示したもの。矢尻は 1.8kb のプレプロ HPCPB mRNA、ならびに 1.5kb のプレプロヒト脳 CPB mRNA (A) および 2.0kb のヒト β -アクチン mRNA (B) の移動位置を示す。

図 6 は、プレプロ HPCPB に対するポリクローナル抗体の調製およびウエスタンブロット解析を示す写真である。(A)ベンズアミジン-セファロースと結合した画分の SDS-PAGE プロフィール。左: 図 1A と同じ分子量マーカーの移動位置。矢尻: 40kDa プロテアーゼの移動位置。(B)未変性 PAGE によって分離した画分を抗体用いてウエスタンブロット解析した結果である。画分 17~21 (レーン 1~5) を SDS-PAGE によって分離した。左の数字および矢尻は A と同じである。(C)抗プレプロヒト脳 CPB 抗体 (レーン 1~4) または抗 C14 抗体 (レーン 5~7) を用いた海馬ホモジネートのウエスタンブロット解析。左の数字および矢印は A と同じである。矢尻は 40kDa プロテアーゼ (大きな矢尻) および 30kDa 成熟型 (小さな矢尻) の移動位置を示す。

図 7 は、ヒト正常脳切片の免疫組織化学分析を示す写真である。用いた抗体は抗プレプロヒト脳 CPB 抗体 (A、B、C、F および I) または抗 C14 抗体 (D、E、G および H) である。(A)海馬の全体像。錐体ニューロンはすべて免疫反応性を示す。倍率 5 倍。(B)海馬実質における錐体ニューロンおよび活性化ミクログリアでは細胞質に免疫反応性が認められる。倍率 400 倍。(C)錐体ニューロンに接着した活性化ミクログリア。倍率 600 倍。(D)錐体ニューロンの細胞体には顆粒状の抗 C14 免疫反応性が認められる。倍率 400 倍。(E)外側膝状体の血管周囲に位置する活性化ミクログリア。倍率 400 倍。(F)および(G)外側膝状体ニューロンは

抗ヒト脳 CPB (F) および抗 C14 (G) 免疫反応性を示す。倍率 400 倍。(H) 上衣細胞の細胞質における抗 C14 免疫活性。倍率 200 倍。(I) 脈絡叢細胞の細胞質における抗プレプロヒト脳 CPB 免疫反応性。倍率 200 倍。

図 8 は、免疫蛍光共焦点レーザー顕微鏡観察を示す写真である。海馬の錐体ニューロン (A、B、C、G、H、I、J、K および L) および外側膝状体ニューロン (D、E および F) の脳切片に、抗ニューロフィラメント抗体 (FITC、緑色) と抗プレプロヒト脳 CPB 抗体 (テキサスレッド、赤色) (A、B、C、G、H および I)、抗ニューロフィラメント抗体 (FITC) と抗 C14 抗体 (テキサスレッド) (D、E および F)、または抗 A β 1/40 抗体 (FITC) と抗 C14 抗体 (テキサスレッド) (J、K および L) の組み合わせによる二重染色を施した。C、F、I および L の顕微鏡写真では、2 つの免疫反応性が融合した像 (黄色) が認められる。倍率: 200 倍 (J、K および L)、400 倍 (J、K および L を除くすべて)。

図 9 は、孤発性アルツハイマー病患者の脳切片の免疫組織化学分析を示す写真である。(A): 海馬の錐体ニューロン。一部のニューロンでは抗プレプロヒト脳 CPB 免疫反応性の低下が認められる。倍率 400 倍。(B および C): 海馬内にグリア浸潤を伴う (B) または伴わない (C)、抗 C14 免疫反応性の細胞外沈着。倍率 400 倍。(D および E): 抗 CD68 抗体 (C) および抗 C14 抗体 (D) で染色した 2 枚の連続切片。海馬内の CD68 陽性ミクログリアの一部は抗 C14 免疫反応性も呈する。倍率 200 倍。(F): 活性化ミクログリアのクラスターは海馬内でプレプロヒト脳 CPB 免疫反応性を示す。倍率 200 倍。(G): アミロイド体は抗 C14 免疫反応性を発現しない。倍率 200 倍。

図 10 は、ラット精巣の免疫組織化学分析を示す写真である。間質のラディッヒ細胞の細胞質が抗 C14 モジュール抗体 (ヒト脳 CPB の C 末端部分を認識する) で濃く染色されている。上が 200 倍、下が 400 倍の写真である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】 海馬ホモジネートからの 40kDa プロテアーゼの調製、および APP タンパク質分解の解析

神経疾患以外の疾患で死亡した患者 5 例 (55~82 歳) および孤発性アルツハイマー病で死亡した 5 例 (60~84 歳) の合計 10 例の脳標本を剖検時に死後 5 時間以内に採取した。側頭葉切片を作製し、液体窒素中にて凍結し、 -110°C で保存した。ホモジネートの調製には、凍結標本から海馬領域 (約 4g) を摘出し、続いて 50mM Tris-HCl (pH7.5) / 1mM EDTA / 2mM フェニルメタンスルホニルフルオリドからなる滅菌ホモジナイズ用緩衝液 15ml 中にて解凍し、その後、Dounce ホモジナイザーにて氷上でホモジナイズした。ホモジネートは 39,000g、30 分間で遠心分離を行った。上清を 40% 硫酸アンモニウムで沈殿させ、沈殿物を氷冷したホモジナイズ用緩衝液に対して透析した。この透析物を海馬ホモジネートとして用いた。天然型脳 APP は、記載されている通り (Matsumoto, A. and Fujiwara, Y. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 217, 21-27) に、抗 cAPP 抗体 (Matsumoto, A. and Fujiwara, Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 361-365) を用いたホモジネートの免疫沈降によって調製した。海馬ホモジネート (1 回の調製当たり約 10mg) を、平衡化緩衝液として 20mM Tris-HCl (pH7.5) を用いて、広範囲のセリンプロテアーゼを捕捉するベンズアミジン-セファロースTM6B アフィニティカラム (Amersham Pharmacia, UK) によるクロマトグラフにかけた。通過画分を回収した後、溶出物の 280nm での光学濃度がベースライン値に達するまでカラムを平衡化緩衝液で激しく洗浄した。カラムと結合した画分を、20mM Tris-HCl (pH7.5) および 0.2M NaCl からなる溶出緩衝液を用いて回収し、次いで氷冷した 10mM Tris-HCl (pH7.5) に対して透析した上で凍結乾燥した。クーマシーブリリアントブルー染色による全結合画分の未変性 PAGE プロフィールを図 1A に示す。

タンパク質分解活性を損なわずに結合画分を分離するため、SDS を用いずに未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。未変性 PAGE には、液相回収装置 (Biophoresis™ 3、Atto、Japan) を備えた調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置および Tris-グリシン緩衝系を用いた (Smith, J.A. (1989) Electrophoretic separation of proteins. In Ausubel, F.M. et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology., John Wiley and Sons, New York, USA, pp.10.2.1-10.2.9)。約 3mg の結合画分を未変性 PAGE により分子量 20~100kDa の範囲の 61 画分に分離した。各画分の一部を SDS-PAGE に供し、銀染色によって可視化した (図 1B)。

各画分を天然型脳 APP 分解活性に関して分析するため、まず、1mM Zn^{2+} の存在下にて、ヒト海馬から調製した約 0.1pmol の天然型脳 APP を各画分 (約 0.05pmol) とともに 37°C で 3 時間インキュベートした。続いて、目的とするタンパク質分解活性を得るため、各反応混合物を SDS-PAGE 用のウェルに並べて泳動し、抗 A β 1/14 抗体 (Calbiochem) を用いたウェスタンブロット解析を以下のようにして行った。

SDS-PAGE によるタンパク質分離後にタンパク質をゲルから Hybond C ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia、UK) にブロットし、その後で 5% ウシ血清アルブミンを含む Tris 緩衝生理食塩水 (100mM Tris-HCl (pH7.5)、140mM NaCl および 0.1% Tween 20) 中に膜を 1 時間浸漬することにより、非特異的結合をブロックした。次に上記の緩衝液を 3 回交換しながら膜を 45 分間洗浄し、引き続いて Tris 緩衝生理食塩水で適度に希釈した一次抗体 (抗 A β 1/14 抗体) とともに 4°C で 16 時間インキュベートした。これを上記の通りに再び洗浄した後、1:2000 に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ二次抗体とともに膜を室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、ECL 化学発光検出システム (Amersham Pharmacia、UK) を用いて、シグナルを X 線フィルムで検出した。

解析した 61 画分のうち、分子量約 40kDa を含む画分 19 と分子量約 30kDa を含む画分 11 に同程度のタンパク質分解活性が認められた。解析の結果、画分 19 のタンパク質成分には均質性がなく、画分 11 の成分は均質であったが室温では 30 分以内に活性が消失し、-20°Cでの長期保存（2 週間）によっても活性が消失した。このため、タンパク質分解活性を有する分子量 40kDa を含む画分 19 をさらに精製することにした。

合計 5 回の調製用電気泳動により充分量の画分 19 を回収した（図 1B）。画分 19（約 8 μ g）を均質化するため、20mM Tris-HCl（pH7.5）を平衡化緩衝液とする 1mM Mono S イオン交換カラムにかけた。洗浄後、20mM Tris-HCl（pH7.5）/0.2M NaCl を溶出緩衝液として結合画分を回収した。この結果、画分 19 からは 40kDa タンパク質分解活性がカラム中に捕捉され、溶出によって回収されたが、共に挙動していた他のタンパク質はそのまま通過した（図 1C）。続いてこれに上記の通りに透析および凍結乾燥を行い、ヒト脳 CPB（HBCPB）標品を得た。ベンズアミジン-セファロースカラムに結合した画分（約 15mg）からのヒト脳 CPB の回収量は 2 μ g であった（約 5pmol）。

単離した 40kDa プロテアーゼのタンパク質分解活性を解析するため、1mM Zn^{2+} の存在下にて 37°Cで 3 時間、脳 APP 基質（約 0.1pmol）を 40kDa プロテアーゼ（0.005~0.1pmol）と共にインキュベートし、反応産物の解析は抗 A β 1/14 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって解析した（図 2）。以上の反応条件下で 40kDa タンパク質は天然型脳 APP を分解し、5.5kDa 断片を主成分とする 3~11kDa の A β 含有ペプチドを生成した（図 2、レーン 5 および 6）。同様の反応を、5mM EDTA、または 1mM ジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子（BioPur、Switzerland）の存在下で行ったところ、EDTA（図 2、レーン 2）およびジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子（図 2、レーン 4）によって反応は完全に阻害された。コンドロイチナーゼ ABC 処理の効果を検証するため、まずコンドロイチナーゼ ABC の酵素活性を阻害する Zn^{2+} を含まない条件下において、20mM Tris

-HCl (pH7.0) 中にて 0.1pmol の天然型脳 APP (を 0.5pmol のプロテアーゼ非含有コンドロイチナーゼ ABC (Seikagaku, Japan) とともに 37°Cで 3 時間インキュベートし、その後、反応混合物を 65°Cで 15 分間インキュベートして酵素を変性させた後、上記と同様にタンパク質分解反応を行った。その結果、反応はほぼ完全に阻害されることが判明した (図 2、レーン 3)。また、APP の細胞質ドメインの一部に対応するオリゴペプチド NH₂-TPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFE-COOH (配列番号: 5) (APP695 の 668~691 番目のアミノ酸) に対して産生させた抗 APP-CT 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、5.5kDa 断片が主要な切断産物として検出された (図 2、レーン 8)。また、抗 40kDa プロテアーゼ抗体あるいは抗 C14 抗体の存在下 (反応混合液の 1/50 の容量) では、このプロテオリシスは完全に阻害された (図 2、レーン 9 および 10)。

抗 A β 1/14 抗体、抗 APP-CT 抗体のいずれを用いても脳 APP からの主要な分解産物として 5.5kDa 断片が検出された (図 2) ことは、この断片が A β の N 末端の近傍と、膜貫通部分の近傍にある APP 細胞質ドメインにおける切断によって生成され、ほぼ完全な A β にわたっていることを示唆している。ヒト脳 CPB には A β の 15~17 番目のアミノ酸残基を切断する α セクレターゼ様活性はなく、このため抗 APP-CT ドメインを有する C 末端 APP 断片はないと考えられる。

【実施例 2】 40kDa プロテアーゼをコードする cDNA の分子クローニングおよび構造解析

N 末端アミノ酸配列決定に基づいて合成したオリゴヌクレオチドによる海馬 cDNA ライブラリーのスクリーニングによって cDNA クローンを単離するために、40 kDa および 30kDa タンパク質のそれぞれを Immobilon P[®] フィルター (Millipore, USA) 上に固定し、続いてエドマン分解を行った。40kDa タンパク質のマイクロシーケンシング分析は成功しなかったが、これは N 末端がブロックされていたためと考えられる。30kDa タンパク質のシーケンシングの結果を表 1 に示す。表は、各サイクルにおける各アミノ酸残基の収量を pmol 単位で示した。最も多

量に回収されたアミノ酸に下線を施した。各アミノ酸残基は以下の通りに略記した。D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、N: アスパラギン、S: セリン、T: トレオニン、Q: グルタミン、G: グリシン、H: ヒスチジン、A: アラニン、Y: チロシン、R: アルギニン、P: プロリン、M: メチオニン、V: バリン、W: トリプトファン、K: リジン、F: フェニルアラニン、I: イソロイシン、L: ロイシン。

表 1

調製した 30kDa 蛋白のエドマン分解産物の収量 (pmol 単位)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
D	2.7	3.2	3.1	2.7	4.9	3.3	3.2	3.4	3.4	4.0	2.2	2.4	3.3	2.1	2.1
E	5.4	4.5	4.9	3.4	3.9	4.3	<u>33.0</u>	6.0	4.7	3.4	4.2	4.6	3.7	<u>22.1</u>	5.4
N	5.1	4.4	4.0	2.6	1.8	3.5	2.9	2.9	2.5	3.4	2.5	2.4	<u>3.3</u>	2.5	4.5
S	5.1	<u>24.6</u>	7.3	<u>20.6</u>	6.3	3.1	3.2	3.8	2.9	2.8	<u>23.3</u>	5.4	2.9	3.7	4.1
T	3.8	3.4	3.6	2.3	2.5	2.4	2.5	2.6	2.4	3.3	3.5	2.4	2.5	2.3	2.3
Q	5.5	4.5	3.8	2.9	2.9	3.7	4.8	<u>25.4</u>	3.6	3.4	2.4	3.7	3.6	3.8	3.4
G	4.3	4.4	3.4	3.2	3.0	2.4	2.5	3.3	4.8	2.6	4.1	3.3	3.5	3.4	2.5
H	3.6	2.4	1.7	1.9	2.5	2.4	1.9	3.8	3.4	<u>22.0</u>	5.4	3.5	3.7	3.9	2.7
A	<u>34.1</u>	6.5	<u>29.9</u>	4.1	5.2	4.7	3.6	3.9	4.9	3.9	7.4	4.9	6.6	3.9	4.9
Y	7.5	5.3	5.0	5.2	<u>41.1</u>	<u>29.5</u>	6.4	4.0	<u>23.7</u>	5.7	3.9	3.4	2.3	2.5	2.6
R	3.4	3.8	2.4	3.1	2.9	3.5	2.3	3.4	3.2	3.0	3.5	3.2	3.3	3.4	3.4
P	3.9	3.2	3.2	3.5	2.4	2.8	3.1	3.3	3.6	3.9	2.4	2.9	2.3	2.6	2.5
M	2.4	2.0	1.3	1.0	1.4	1.6	1.4	1.4	1.1	2.3	2.0	2.6	1.9	2.3	2.1
V	3.2	3.0	3.1	3.7	3.0	3.5	3.6	3.8	4.1	4.3	2.4	3.9	4.0	3.1	3.6
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	3.6	2.4	3.9	3.8	3.8	3.3	3.0	3.5	2.9	2.5	2.0	2.1	1.9	2.5	2.9
F	2.9	1.4	1.4	1.5	1.8	1.9	1.9	1.5	2.0	1.5	2.3	3.0	2.2	2.7	3.1
I	3.5	3.3	3.6	4.2	3.5	2.9	3.4	3.4	3.1	3.1	4.5	3.4	4.4	4.8	<u>24.1</u>
L	2.5	2.4	2.5	3.7	3.5	4.1	3.6	2.4	2.2	2.3	2.6	<u>22.3</u>	4.4	3.6	2.7

その結果、30kDa タンパク質は成熟型ヒト血漿 CPB の N 末端配列と同一であることが明らかになった。30kDa タンパク質の実体を解明し、40kDa タンパク質と 30kDa タンパク質との関連を明らかにするために、アミノ酸配列決定の結果を用いた海馬 mRNA の RT-PCR 解析およびヒト海馬 cDNA ライブラリーの免疫学的スク

リーニングという2つの方法によって、40kDa タンパク質をコードする cDNA の分子クローニングを行った。

まず、quickPrepTM mRNA 精製キット (Amersham Pharmacia、UK) を用いて、2例の脳の凍結海馬ブロックからポリ(A)⁺RNA (poly(A)-rich RNA) を調製した。Gubler と Hoffmann の方法 (Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) *Gene*, 25, 263-269) に従ってヒト海馬 cDNA ライブラリーを作製した。第1ストランドの cDNA は、合成オリゴ(dT)をプライマーとしてクローン化 Moloney マウス白血病ウイルス逆転写酵素 (FPLC-pureTM、Amersham Pharmacia、UK) を用いて、ポリ(A)⁺RNA 1.5 μ g から合成した。続いて、クローン化大腸菌リボヌクレアーゼ H (Amersham Pharmacia、UK) の存在下でクローン化大腸菌 DNA ポリメラーゼ I (Takara、Japan) を用いて、第1ストランドの DNA から第2ストランドの cDNA を合成した。T4 ファージポリメラーゼ (Takara、Japan) によって2本鎖 cDNA を平滑末端化し、大腸菌 EcoRI メチラーゼ (Takara、Japan) を用いてその EcoRI I 部位を修飾した後に、EcoRI リンカーを連結した。DNA ライゲーションキット (Takara、Japan) を用いて λ gt11 ファージベクターの EcoRI アームと cDNA との連結を行い、続いて *in vitro* でパッケージングを行った (PhageMakerTM、Takara、Japan)。宿主菌として大腸菌 Y1090r⁻を用いた場合、このライブラリーの効率は 9.0×10^5 プラーク形成単位(pfu)/ポリ(A)⁺RNA 1 μ g であった。

次に、単離した 40kDa タンパク質に対するポリクローナル抗体 (1:1500 に希釈) (後述) を用いて、上記の λ gt11 ヒト海馬ライブラリーの免疫学的スクリーニングを行った (StJohn, T.P. (1989) *Screening with antibodies*. In Ausubel, F.M. et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*., John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 6.7.1-6.7-5)。 3×10^5 プラーク形成単位 (pfu) のファージクローンのスクリーニングにより3つの陽性クローンが分離された。制限エンドヌクレアーゼによる消化プロファイルはいずれの DNA も極めて類似していたため、最も長い挿入断片を持つクローンの構造を解析した。塩

基配列決定は PRISM™ 自動シーケンサー (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。

この結果同定された 1544bp 長の cDNA (配列番号: 1) には、360 個のアミノ酸残基 (配列番号: 2) をコードすると予想される 1083bp 長の読み枠が 1 つ存在する (図 3)。コンピュータを用いたホモロジー解析により、この cDNA はヒト血漿 CPB (HPCPB) (Eaton, D.L. et al.(1991) J. Biol.Chem., 266, 21833-21838) と高い相同性があることが示された。相同性を有する他のタンパク質としては、組織型 CPB (Yamamoto, K.K. et al.(1992) J. Biol. Chem., 267, 2575-2581) および肥満細胞 CPB (Goldstein, S.M. et al.(1989) J. Clin. Invest., 83, 1630-1636) が同定された。プレプロヒト血漿 CPB と、同定されたヒト脳プロテアーゼ (プレプロヒト脳 CPB) の構造の比較では、後者 (プレプロヒト脳 CPB) も、成熟型酵素 (ヒト脳 CPB) では 246 アミノ酸、ヒト血漿 CPB では 317 アミノ酸) の前にシグナルペプチド (22 アミノ酸) および活性化ペプチド (92 アミノ酸) が存在するという共通の CP 構造を持つことが示された (図 4A)。両者の差は成熟型酵素の配列にある。第 1 に、成熟型血漿酵素の中央部にある 37 個のアミノ酸残基は、プレプロヒト血漿 CPB の 198~334 番目のアミノ酸残基 (プレプロヒト血漿 CPB cDNA の 633~743 番目のヌクレオチド残基) に対応するが、これはヒト脳 CPB には存在しない。第 2 に、プレプロヒト血漿 CPB cDNA の 1190~1241 番目の残基に対応するヌクレオチドが存在しないために 40 個のアミノ酸残基 (プレプロヒト血漿 CPB の 384~423 番目のアミノ酸残基) の欠失がもたらされ、フレームシフトによってプレプロヒト脳 CPB の C 末端に特有な 14 個のアミノ酸残基が生じる。前者の変化は最終的にはインフレーム欠失をもたらし、後者は別の欠失を引き起こし、そのためにプレプロヒト血漿 CPB mRNA の 3' 非コード領域 (4 アミノ酸) および異なる停止コドンを含む異なるフレームの翻訳に起因するアミノ酸の変異が生じる。

ヒト脳 CPB に特有な C 末端 14 アミノ酸残基 (C14) に相同なペプチド配列の有無をペプチドおよびタンパク質に関する最新のデータベースで検索した (図 4 B)。最も相同性の高かったペプチドは、種々の植物種の葉緑体 ATP 合成酵素 γ サブユニットのドメイン中に認められた (Inohara, N. et al. (1991) J. Biol. Chem., 266, 7333-7338)。C14 ペプチドと葉緑体の光依存的調節ドメインの N 末端領域に位置するこれらの植物ペプチドとの間の相同性は極めて高い (85% を上回った)。9 個の同一アミノ酸に加えて、アミノ酸の 4 番目 (プロリン)、5 番目 (バリン) および 13 番目 (ロイシン) はそれぞれ機能的に同一な (中性かつ疎水性) アミノ酸であるバリン、トレオニンおよびプロリンによって置換されている。

次に、30kDa タンパク質をコードする cDNA を得るため、免疫学的スクリーニングとは独立に、RT-PCR 法および 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 系 (GIBCO-BRL、USA) を用いて脳 CPB の cDNA の単離を試みた。テンプレートとしては、上記ライブラリー作製に用いたものとは異なり、3 例の正常脳から調製した海馬 poly(A)⁺RNA を用いた。cDNA はアミノ酸配列決定結果 (表 1) に基づいて合成したセンスオリゴヌクレオチド (5'-GCCTCCGCATCGTACTATGAACAGTATCA C-3' / 配列番号: 6) を用い、アンチセンスプライマーとしてオリゴ(dT)を有するアダプタープライマーを用いて SUPERScript™ 逆転写酵素 (GIBCO-BRL、USA) により合成した。その結果、RT-PCR 産物として 1077bp の単一のバンドのみが検出された (図 4C、レーン 1)。HPLC による精製後に PCR 産物のシーケンス解析を行った。塩基配列決定は PRISM™ 自動シーケンサー (Applied Biosystems、USA) を用いて行った。

その結果、この配列は成熟型ヒト脳 CPB に対応する、ブレプロヒト脳 CPB cDNA のヌクレオチド 360~1436 と同一であった。すなわち、2 種のクローニング手順により得られたいずれの cDNA も、海馬内の同一の mRNA に由来することが示された。また、この結果から、30kDa のタンパク質は、40kDa のタンパク質と同一

の遺伝子にコードされており、40kDa タンパク質の N 末部分が切り出されて、30 kDa のヒト脳 CPB 成熟タンパク質が生成するものと考えられる。

〔実施例 3〕 各種組織におけるノーザンブロット解析

種々の臓器からの RNA 試料を用いて、ブレプロヒト脳 CPB mRNA またはそのホモログの発現を解析した。まず、正常剖検標本から調製したヒトの脳（海馬）、心臓、脾臓、腎臓、肝臓および脾臓に由来するポリ(A)⁺RNA 1 μ g を、MOPS (3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸) 緩衝液 (20mM MOPS (pH7.0)、5mM NaOAc および 1mM EDTA、6.6%ホルムアルデヒドを含む) 中で 1%アガロースゲルにて電気泳動した。電気泳動後にキャピラリーブロット法によってゲルからナイロン膜 (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia, UK) に転写し、ベーキングによって固定した。続いてブロットを ExpressHybTMハイブリダイゼーション溶液 (Clontech, USA) 中にて 68°C で 1 時間ハイブリダイズさせた。

プローブは、5'-GGTTCATAGGCCATAATCGAATGT-3' (配列番号: 7) をセンスプライマー (cDNA のヌクレオチド 596~618 に対応)、5'-TCAGGGGCATTAAACATTCCTAA T-3' (配列番号: 8) をアンチセンスプライマー (cDNA のヌクレオチド 1135~1112 に対応) として用い、Takara TaqTM組み換え Taq ポリメラーゼ (Takara, Japan) を用いた PCR によって増幅したブレプロヒト脳 CPB cDNA の C 末端部分 538 bp を用いた (図 4C、レーン 2)。ヒト β -アクチン cDNA プローブ (Clontech, USA) を対照として用いた。以上のプローブには、ランダムプライマー-DNA ラベリングキット (Takara, Japan) を用いて [α -³²P]dCTP による放射標識を行った。ブロットを 2 \times SSC 中、続いて 2 \times SSC、0.1%SDS 中にて室温で 20 分ずつ各 2 回洗浄し、さらに 0.1 \times SSC、0.1%SDS 中で 65°C、40 分間の洗浄を 2 回行った。

ブレプロヒト脳 CPB cDNA の DNA 配列がブレプロヒト血漿 CPB cDNA と非常に相溶性が高いことから予想された通り (図 4A)、ヒト肝臓ではこのプローブにより 1.8kb バンドの大量発現が認められた (図 5、レーン 6)。これに対して、ヒト脳 RNA では 1.5kb バンドの発現がはるかに低い強度で検出された (図 5、レーン 6)。

ン1)。心臓、胎盤、脾臓、腎臓および脾臓由来の RNA 試料は、このプローブに反応するシグナルを発現しなかった（図 5、レーン 2、3、4、5 および 7）。脳および肝臓における mRNA シグナルのサイズの差は、プレプロヒト脳 CPB およびプレプロヒト血漿 CPB の cDNA のコード領域のサイズの差とよく一致していた。また、この結果は、脾臓内で大量に発現される組織型 CP をこのプローブが分離することを示している。

【実施例 4】 40kDa プロテアーゼおよびプロテアーゼの C 末端 14 アミノ酸ペプチドに対するポリクローナル抗体の調製、ならびにウエスタンブロット解析

ベンズアミジン-セファロースカラムに結合した画分を調製用 SDS-PAGE によって分離し、液相回収装置中に回収して、ニュージーランドホワイットウサギ 2 匹を免疫するのに十分な量 (2mg) の 40kDa プロテアーゼを調製した。40kDa のタンパク質が均質なものとして分離されたことは、SDS-PAGE プロフィールから明らかである（図 6A）。未変性 PAGE の場合とは異なり、最初の分離段階が SDS-PAGE の場合には、変性した 40kDa タンパク質を均質化するためのイオン交換クロマトグラフィーによる分離をさらに行う必要はなかった。調製された 40kDa のプロテアーゼタンパク質を抗原として用いて、ウサギに抗プレプロヒト脳 CPB ポリクローナル抗体を産生させた。抗血清を得、IgG 画分を EZ Prep (Pharmacia) により精製した。抗原に対する特異性を抗体価で検討したところ、ブレイミューン血清（対照抗体）と比較して 2000 倍の感度を有することが示された。これとは別に、このプロテアーゼに特有な C 末端 14 アミノ酸残基に対応するオリゴペプチド $\text{NH}_2\text{-SNPPVEKLLPLSLK-COOH}$ （配列番号：9）に対して、抗 C14 抗体を産生させた。このオリゴペプチドは、3-マレイミド安息香酸 N-ヒドロキシサクシミドエステル (Sigma, USA) を用いて、キーホールリンベットヘモシアニン (Calbiochem, USA) と結合させてからウサギの免疫化に用いた。得られた抗血清を、オリゴペプチドを結合させたセファロース CL-4B カラムにてアフィニティ精製した。

この特異性を抗体価で検討したところ、ブレイミューン血清（対照抗体）と比較してオリゴペプチドに対して 1500 倍の感度を有することが示された。

未変性 PAGE によって分離した画分を SDS-PAGE 後、抗原として用いて、実施例 1 と同様のウェスタンブロット解析によって上記の抗体の特異性を検討した（図 6B）。その結果、抗プレプロヒト脳 CPB ポリクローナル抗体は、単一の 40kDa バンドを検出し、そのバンド強度はタンパク質分解活性が最初に認められた画分 19（図 1B）で最も高かった。種々の脳試料から得た海馬ホモジネートの解析では、この抗体によって 40kDa および 30kDa のバンドが検出された（図 6C、レーン 1～4）。この結果は、分子量 40kDa および 30kDa に対応する 2 つの未変性 PAGE 画分に APP 分解活性があり、30kDa タンパク質が成熟型プレプロヒト脳 CPB であるとの所見と関連している。抗 C14 抗体を用いたウェスタンブロット解析では、脳試料に関しては本質的に同じ結果が得られたが（図 6C、レーン 5～7）、ヒト肝臓ホモジネート中には免疫反応性バンドは全く検出されなかった。これは、抗 C14 抗体がヒト脳内のヒト脳 CPB を認識することを意味している。

正常人およびアルツハイマー病患者の髄液および抹消血清をサンプルとし、抗 C14 抗体を用いたウェスタン法により解析したところ、いずれのサンプルにも抗 C14 抗体の免疫反応性が検出された。また、抹消血清中では、加齢に伴い免疫反応性が増加する傾向が認められた。

〔実施例 5〕 免疫組織化学分析

実施例 4 で作製した、ヒト脳 CPB（HBCPB）を特異的に認識する抗体を用いて、以下の免疫組織化学分析を行った。剖検直後に、免疫組織化学試験に用いるための標本を 10%ホルムアルデヒド中に 1 週間以上保存することによって固定して、5 μ m 厚のパラフィン切片を作製した。免疫組織化学分析はアビジン-ビオチン複合体（ABC）法によって行った。脱パラフィン処理後、3%過酸化水素中に 5 分間浸漬することによって内因性ペルオキシダーゼの失活を行い、切片をクエン酸ナトリウム緩衝液中に浸し、続いてリン酸緩衝生理食塩水中に浸漬した。次いでこ

れを 1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水で 1:100 に希釈した目的の一次抗体とともにモイストチェンバーにて 4°Cで一晩インキュベートした。反応産物を 3,3'-ジアミノベンジジンによって可視化し、顕微鏡で観察した。対照標本では、一次抗体として免疫前血清を用いた。

5 例の正常脳ではすべて、検討したニューロンの大半で抗プレプロヒト脳 CPB および抗 C14 免疫反応性がいずれも細胞質（神経細胞体）内で検出された（図 7）。海馬錐体ニューロン（図 7A、B、C および D）および外側膝状体ニューロン（図 7E、F および G）は特にこれらの抗体に関して均一に免疫反応性であった。舌下運動ニューロン、視床ニューロン、基底核などの他のニューロンにも免疫反応性が認められたが、海馬顆粒細胞はこれらの抗体では染色されなかった。神経細胞体に限局的なヒト脳 CPB の発現は顆粒状かつユビキタスであり、抗 C14 免疫反応性も顆粒状に発現された（図 7D および G）。抗ヒト CD68 抗体を用いた染色によって同定された海馬実質中のミクログリアの一部は、抗ヒト脳 CPB および抗 C14 免疫反応性をいずれも強く発現した。このようなミクログリアは細胞外基質内（図 7B）、ニューロンと直接隣接した位置（図 7C）または血管周囲（図 7E）に位置する。抗グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）抗体を用いた本発明者らの解析では、すべての正常脳に関して抗プレプロヒト脳 CPB および抗 C14 免疫反応性を同時発現する GFAP 陽性アストロサイトは認められなかった。ヒト脳 CPB プロテアーゼを明瞭に発現した他の種類の細胞は、上皮細胞および脈絡叢細胞（図 7H および I）であり、細胞質でのユビキタスな発現は顆粒状であった。

免疫蛍光共焦点レーザー顕微鏡検査により、ニューロンにおけるこのプロテアーゼの正確な細胞内局在を検討した（図 8）。抗体としては、抗ヒトニューロフィラメント抗体（Sanbio、USA）、抗ヒト CD68 モノクローナル抗体（R&D Systems、USA）、抗ヒト GFAP モノクローナル抗体（Advance Immunochemical、USA）、抗 A β 1/40 抗体（US Peptides、USA）、抗プレプロヒト脳 CPB 抗体および C14 抗体を用い、MRC-1024 共焦点レーザー顕微鏡（Bio Rad、USA）で観察した。この

結果、海馬錐体ニューロン（図 8A、B、C、G、H および I）、外側膝状体ニューロン（図 8D、E、および F）ともに、免疫反応性は明瞭に細胞質（神経細胞体）内に典型的な顆粒状様式で存在しており、抗ヒト脳 CPB（図 8A～F）および抗 C14（図 8G～I）抗体のいずれによっても検出された。A β ペプチドとこのプロテアーゼの局在との関係を解析するために抗ヒト A β 1/40 および抗 C14 抗体を用いて海馬切片を解析した（図 8J、K および L）。この 2 つの免疫反応性は錐体ニューロンの神経細胞体内に顆粒として共存していた。C14 免疫反応性はグリア（ミクログリアと思われる）内でも認められたが、A β 1/40 免疫反応性は主に神経細胞体に認められた。

5 例の孤発性アルツハイマー病患者から得た脳組織も解析した。アルツハイマー病患者のニューロン、特に海馬錐体ニューロンでは、ヒト脳 CPB は正常試料のようにユビキタスではなく、錐体ニューロンの一部では免疫反応性が全く認められなかった（図 9A および B）。検討したすべてのアルツハイマー病患者の脳で海馬実質中に抗 C14 免疫反応性の細胞外沈着が検出され、これにはグリア浸潤を伴う斑状沈着として認められるもの（図 9B）と、細胞浸潤を伴わないより均一な沈着として認められるもの（図 9C）があった。正常脳と比較して、アルツハイマー病患者の脳では抗ブレプロヒト脳 CPB および抗 C14 抗体に対する免疫反応性を有するミクログリアの数が増加しており、海馬実質中に免疫細胞がクラスターとして認められた（図 9F）。ミクログリアを特異的に認識する抗 CD68 抗体または C14 抗体を用いて連続切片を解析したところ、免疫反応性細胞はミクログリアであり、この細胞ではいずれの抗体でも免疫反応性を示す呈色が共存していた（図 9D および E）。検討したすべてのアルツハイマー病患者で海馬内に老人斑が存在しており、図 9B に示す通り、抗 C14 免疫反応性は老人斑の位置と共通していた。アミロイド体は検討したすべてのアルツハイマー病患者の脳組織中で検出されたが、抗 C14 抗体に関する免疫反応性はいずれも発現しなかった（図 9

G)。アルツハイマー病患者の脳での上皮細胞および脈絡叢細胞の免疫反応性は正常脳と差が認められなかった。

〔実施例6〕 既知のCPBファミリーとの比較検討

CPBの精製および特徴分析が最初になされて以来 (Folk, J.E. and Gladner, J. A. (1958) J. Biol.Chem., 231, 379-393)、CPBが明らかに同定されているのは膵臓のみであった (Pascual, R. et al.(1989) Eur. J. Biochem., 179, 606-616; Yamamoto, K.K. et al.(1992) J. Biol. Chem., 267, 2575-2581)。このプロテアーゼは以前には消化器官のみから分泌される消化酵素と考えられていた。比較的最近になって、CPBとその相同酵素は、肥満細胞分泌顆粒などの消化器以外の組織 (Goldstein, S.M. et al.(1989) J. Clin. Invest., 83, 1630-1636; Reynolds, D.S. et al.(1992) J. Clin. Invest., 89, 273-282) や血漿中 (Eaton, D.L. et al.(1991) J. Biol.Chem., 266, 21833-21838) にも見いだされた。詳細な特徴が明らかにされている膵臓内のCPに基づくと、この酵素群には特徴および特異性が異なる成熟型酵素を生成する2つのプレプロCP、すなわちA型 (CPA) およびB型 (CPB) が存在する (Blackburn, S. (1976) Carboxypeptidase A and carboxypeptidase B. In Blackburn, S. (ed.), Enzyme Structure and Function, Marcel Dekker, New York, pp.169-223)。トリプシンはシグナルペプチドおよび活性化ペプチドを除去することにより、CPAとCPBの両方を活性化する。ヒト肥満細胞分泌顆粒内のCPの生化学的特徴は組織型CPの特徴と類似しており、これらの33~40kDaのZn-メタロペプチダーゼは中性からやや塩基性のpHで活性であり、ジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子、EDTA、フェナントロリンおよび8-ヒドロキシキノリンによって阻害され、免疫刺激を受けると肥満細胞から放出される (Goldstein, S.M. et al.(1989) J. Clin. Invest., 83, 1630-1636)。

プレプロヒト脳CPB cDNAの構造解析では、ヒト脳CPBはHPCPBとの相同性が高く (70%を上回る)、ヒト肥満細胞ヒト膵臓CPBとの相同性は中等度 (ほぼ2

5%)であった。ヒト血漿および肥満細胞の CPB と同じく、ヒト脳 CPB には活性化ドメインにアスパラギン結合オリゴサッカライドを生成するグリコシル化部位と推定される 3 つの部位が保存されている (図 3)。これらの CPB の間では、基質結合に関与するアミノ酸残基 (Arg-183、Asn-204、Arg-205、Arg-220、Ser-274、Tyr-275、Tyr-326 および Asp-333) および亜鉛との結合に関与するアミノ酸残基 (His-181、Glu-184 および His-273) は高度に保存されている。これらの 2 つの cDNA に対応するゲノム DNA 構造はまだ決定されていないが、cDNA 構造の比較から、HPCPB 遺伝子はヒト脳 CPB 遺伝子の先祖遺伝子であることが示唆される。ヒト膵臓プレプロ CPB をコードする相同遺伝子の存在という観点から考えると (Reynolds, D.S. et al.(1992) J. Clin. Invest., 89, 273-282)、プレプロヒト脳 CPB cDNA のエキソン-イントロン境界を推定することができる。脳プロテアーゼ (ヒト脳 CPB) では発現されない 37 個のアミノ酸に対応する DNA はヒト膵臓遺伝子のエキソン 7 に対応する 1 つのエキソンによってコードされており、これは選択的スプライシング機構の結果である可能性が高い。プレプロ HPCPB の C 末端部分に位置し、ヒト脳 CPB 中には存在しない 18 個のアミノ酸は、1 つのエキシソンのみによってコードされるわけではない。プレプロ HPCPB mRNA のヌクレオチド 1190~1241 に対応する 52bp の欠失によって HPCPB からの 18 個のアミノ酸 (385~401 アミノ酸残基) の除去およびヒト脳 CPB のフレームシフトが起こり、ヒト脳 CPB に特有の C 末端 14 アミノ酸残基を生じた。以上の所見は、プレプロヒト脳 CPB mRNA が、選択的 RNA スプライシングに由来する組織特異的アイソフォームではなく、プレプロ HPCPB と同じ祖先遺伝子から最近になって進化した別の分子であることを示唆する。

成熟型 CP は一般に塩基性が強く、中性 pH での実効電荷は全体で +10~20 [(Lys+Arg) - (Asp+Glu)] である。構造解析ではヒト脳 CPB は弱塩基性であり、実効電荷は +7 であることが示されたが、肝臓内で合成されるヒト脳 CPB や肥満細胞 CPB はいずれも強塩基性であり、実効電荷は +11~16 である。これらの構造的

特徴は、ヒト脳 CPB も塩基性 CPB ファミリーのメンバーであり、このため C 末端のアルギニンおよびリジン残基に対する特異性を有することを示唆する。

HPCPB の場合、予想される機能は血液凝固時の抗線溶作用であり、部分分解を受けたフィブリン上のプラスミノゲン結合部位がこれによって除去されるために血漿凝血塊の溶解は遅延する (Sakharov, D.V. et al.(1997) J. Biol. Chem., 272, 14477-14482)。さらに、脳、血漿および脾臓の CPB の C 末端部分の構造の比較から、基質結合部位である最も C 末端の残基 (プレプロ HPCPB の第 385 残基のグルタミン) を含む 18 個のアミノ酸残基がヒト脳 CPB には存在しないことが示された。ヒト脳 CPB に特有の C 末端 14 アミノ酸は、同定された他の CP のいずれの部分とも相同性が認められなかった (図 4B)。この配列と最も高い相同性が認められたペプチドは、種々の植物種に由来する植物葉緑体 ATP 合成酵素 γ サブユニットの光依存性調節ドメインと隣接した N 末端部に位置していた (図 4B)。ATP 合成酵素は電子伝達鎖によって生じたプロトンの電気化学的勾配との共役により、ATP を合成する。この γ サブユニットは葉緑体ゲノムではなく核にコードされており、ATP 合成酵素の光依存的調節に必須であると考えられている (Inohara, N. et al.(1991) J.Biol.Chem., 266, 7333-7338)。ヒト脳 CPB で C 末端 14 アミノ酸ペプチドが特有に発現されることの意義はまだ明らかではないが、ATP 合成酵素の重要なドメインと相同性があることから、ATP 依存性プロテアーゼおよび ATP と結合してアセンブルする種々のタンパク質を含んでいる 26S プロテアソームとの関連性が示唆される。

脾臓 CP は単量体として存在するだけでなく、タンパク質分解特性の異なる 1 つまたは 2 つのプロテアーゼとの二重または三重複合体としても存在する (Kerfieleck, B. et al.(1985) Eur. J. Biochem., 151, 515-519)。例えば、ヒト脾臓プロ CPA は分泌顆粒内ではプロプロテイナーゼ E との二重複合体である (Pascual, R. et al.(1989) Eur. J. Biochem., 179, 606-616)。ウシ脾臓内のプロテアーゼはキモトリプシノーゲン C/プロプロテイナーゼ E との三重複合体であ

り (Kobayashi, R. et al.(1981) J. Biol. Chem., 256, 2460-2465)、クジラ
臍臓ではキモトリプシノーゲン C との二重複合体である (Yoneda, T. (1980) C
omp. Biochem. Physiol. 67B, 81-86)。この種のプロテアーゼが相補的なタン
パク質分解特性を有する複合体を形成することには、消化作用を効率化する機能
があると思われる。ヒト脳 CPB の調製を通じて、プロプロテイナーゼ E とキモト
リプシノーゲン C はいずれも分子量やイオン交換クロマトグラフィーにおける親
和度の点でヒト脳 CPB とは異なったことから、ヒト脳 CPB のエンドプロテアーゼ
活性はヒト脳 CPB とのプロテイナーゼ活性複合体によるものではない可能性が高
い。タンパク質分解活性を持つ最終産物は、高感度銀染色によって可視化された
単一の 40kDa バンドであった。さらに、ヒト脳 CPB の調製工程でヒトプロテイナー
ゼ E の自己溶解を誘発する SDS (Sziegoleit, A. et al.(1985) Eur. J. Bio
chem., 151, 595-599) を用いておらず、このプロテイナーゼがヒト脳 CPB とと
もに同時精製されたならば検出されたはずである。

天然型 APP とコンドロイチナーゼで前処理した APP を用いた場合のタンパク質
分解効率の差は、荷電効果がタンパク質分解に影響することを示唆する。中等度
に陽性荷電したヒト脳 CPB は、陰性荷電したコンドロイチン硫酸部分を含む天然
型 APP を、それを含まない APP よりもはるかに効率的に捕捉すると考えられる。
ヒト脳内でこれが成り立つとすれば、APP ファミリーに属する種々の分子が存在
する。脳 APP の一部には、特有のプロテオグリカンの成分であるアピカンが含ま
れる (Shioi, J. et al.(1992) J. Biol. Chem., 267, 13819-13822)。このコ
アタンパク質はエキソン 15 によってコードされる 18 個のアミノ酸を欠失した A
PP695 であり、これにはグルコサミノグリカン結合のための認識シグナル (エキ
ソン 14 とエキソン 16 との間のアミノ酸残基に生じる) と結合したコンドロイチ
ン硫酸複合糖質が含まれる (Pangalos ら、1995 J. Biol. Chem., 270, 10388-1
0391)。抗 cAPP 抗体を用いた天然型脳 APP の免疫沈降の段階で、APP との相同
配列を持つ APLP1 および APLP2 が共沈すると考えられる。実際、コンドロイチン

硫酸は APP との場合と同じように APLP2 の特定のアイソフォームと結合する (Thinakaran, G. et al.(1995) J. Biol. Chem., 270, 16522-16525)。しかし、抗 A β 1/14 抗体を解析に用いた場合には、A β の細胞外ドメインと相同な配列がこれらのタンパク質に存在しないことから、APLP1 および APLP2 に由来する断片は検出されなかった (Wasco, W. et al.(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10758-10762; Sprecher, C.A. et al.(1993) Biochemistry, 32, 4481-4486)。このため、APP および/またはアピカンや、現時点ではまだ同定されていないアイソフォームなどの APP アイソフォームを伴うプロテオグリカンに由来する A β 含有ペプチドは、ヒト脳 CPB の標的となりうる。脳 APP の分子的多様性も、基質-プロテアーゼ間の厳密な関係に関連しており、それによってアルツハイマー病の病態生理の組織および種特異性が生じていると考えられる。

【実施例 7】 カルボキシペプチダーゼとしての蛋白分解作用

合成 A β 1-40 および A β 1-42 (各 0.1pM) を基質としてヒト脳カルボキシペプチダーゼ B (0.01pM から 0.2pM まで) を 37°C で 16 時間作用させると、用量依存的に低分子ペプチドを形成した。ウェスタンブロット解析において、A β 1-40 基質については抗 A β -N 端抗体で低分子化ペプチド (数アミノ酸分がシフト) が確認できるが、これは抗 A β 40 断片抗体では確認できない。一方、A β 1-42 基質についても抗 A β -N 端抗体で低分子化ペプチド (数アミノ酸分がシフト) が確認できるが、これは抗 A β 42 断片抗体では確認できない。これらの実験的事実はヒト脳型カルボキシペプチダーゼ B がニューロン内の A β ペプチドの C 端側アミノ酸を分解する可能性、特に凝集性の高い A β 1-42 を代謝してより毒性の低い A β ペプチドに変換する生理機能をもつ可能性を示唆する。

【実施例 8】 神経外胚葉由来細胞におけるヒト脳 CPB の発現

ヒトおよびラット由来の脾臓および精巣の組織切片についてヒト脳 CPB に対する抗体 (C 端側 14 アミノ酸に対する抗体 : 抗 C14 モジュール抗体) を用いた免

疫組織化学的解析により、いずれの種もランゲルハンス島 β 細胞（インスリン産生細胞）の細胞質、および精巢間質ライディッヒ細胞細胞質（図10）に著明な免疫染色性を認めた。

この結果から、ヒト脳 CPB が、インスリンと同じく β 細胞で産生され β アミロイドと類似した特性をもつアミリンを代謝する機能を有することが示唆される。アミリンのインスリン作用における機能を考慮すれば、ヒト脳 CPB が特定の糖尿病の病態生理に関連する可能性がある。

また、ヒト脳 CPB は、ヒト精巢ライディッヒ細胞の細胞質における発現も認められた。このことからヒト脳 CPB がこの内分泌細胞で産生される多くの蛋白性ホルモンの産生・分泌・分解等に関与している可能性がある。

産業上の利用の可能性

本発明の脳 CPB タンパク質は、脳 APP を切断し、 $A\beta$ 含有ペプチドを生成する生理的活性を有している。また、 $A\beta$ ペプチドを C 末端から分解する生理的活性をも有している。従って、脳 CPB タンパク質は、病的な APP 代謝や $A\beta$ 含有ペプチド生成を制御する治療薬となりうる他、 $A\beta$ ペプチドの生成やそれに関連する疾患（例えば、アルツハイマー病）の発症の分子メカニズムを解明するための有用なツールとなる。さらに、髄液や抹消血中にも微量発現する脳 CPB は、APP・ $A\beta$ 代謝異常を検査・診断するための CNS の病態マーカーとしても有用である。脳 CPB は、また、脳において $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の医薬品候補化合物のスクリーニングに利用することも可能である。即ち、本発明により、脳において $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の予防、治療や検査のための新規かつ有用な方法が提供された。

請求の範囲

1. 配列番号：2 から 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
2. 脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有するタンパク質であって、下記
(a) または (b) より選択されるタンパク質。
(a) 配列番号：2 から 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質。
(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質。
3. 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質をコードする DNA。
4. 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む、請求項 3 に記載の DNA。
5. 請求項 3 または 4 に記載の DNA が挿入されたベクター。
6. 請求項 5 に記載のベクターを保持する宿主細胞。
7. 請求項 6 に記載の宿主細胞を培養し、該細胞内で発現した組み換えタンパク質を該細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の製造方法。
8. 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に対する抗体。
9. 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の部分ペプチド。
10. 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド。
11. 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、
(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

12. 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する化合物。

13. 請求項11に記載の方法により単離されうる、請求項12に記載の化合物。

14. 請求項1または2に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、請求項1または2に記載のタンパク質にその基質を接触させる工程、

(b) 該基質の切断を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合(対照)比較して、請求項1または2に記載のタンパク質により引き起こされる該基質の切断を増加または減少させる活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

15. 基質が脳APPである、請求項14に記載の方法。

16. 請求項1または2に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する活性を有する化合物。

17. 請求項14または15に記載の方法により単離されうる、請求項16に記載の化合物。

18. 請求項1または2に記載のタンパク質を有効成分とする、 $A\beta$ の生成調節剤。

19. 請求項1または2に記載のタンパク質を有効成分とする、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の治療薬。

20. 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、請求項 19 に記載の治療薬。

21. 請求項 12、13、16 または 17 に記載の化合物を有効成分とする、 $A\beta$ 生成調節剤。

22. 請求項 12、13、16 または 17 に記載の化合物を有効成分とする、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の治療薬。

23. 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、請求項 22 に記載の治療薬。

24. 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質を含有することを特徴とする、該タンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット。

25. 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の基質をさらに含む、請求項 24 に記載のキット。

26. 基質が脳 APP である、請求項 25 に記載の方法。

27. 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の検査方法であって、

(a) 被検者から試料を調製する工程、

(b) 該試料に含まれる請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の量を請求項 8 に記載の抗体を用いて検出する工程、を含む方法。

28. 試料が髄液または血清である、請求項 27 に記載の方法。

29. 脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、請求項 27 または 28 に記載の方法。

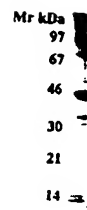
30. 請求項 8 に記載の抗体を含む、脳における $A\beta$ の蓄積を生じる疾患の検査薬。

31. $A\beta$ の蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、請求項30に記載の検査薬。

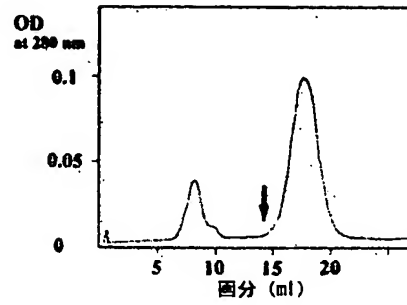
1 / 10

図 1

A

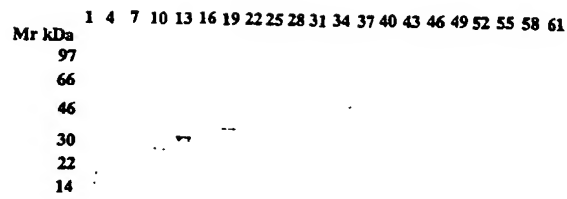


C



B

固分

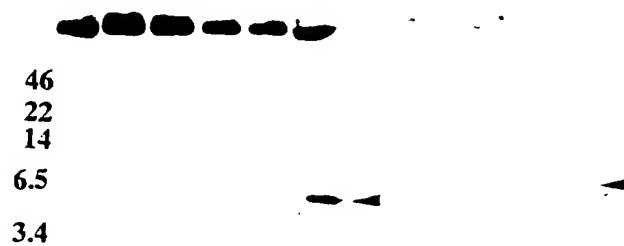


2/10

図 2

プロテアーゼ	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
EDTA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR-ABC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CPI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Mr kDa



3/10

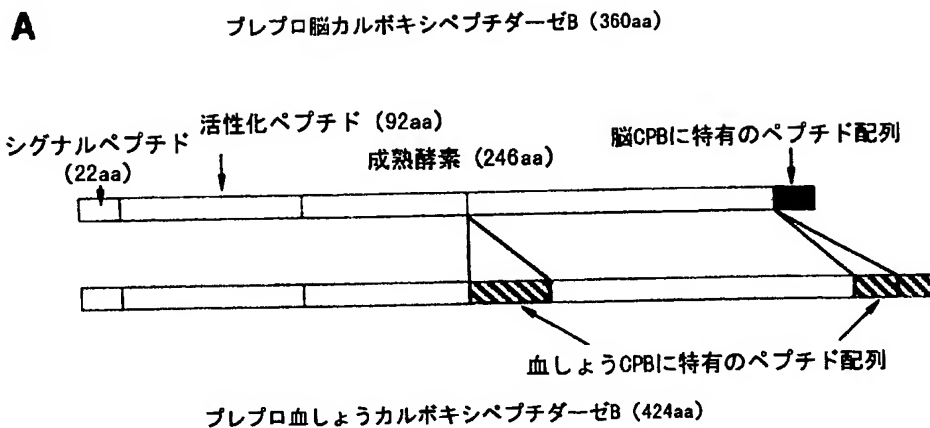
3

agaaaattgctgttggg

18 ATG AAG CTT TGC AGC CTT GCA GTC CTT GTA CCC ATT GTT CTC TTC TGT GAG CAG CAT GTC TTC GCG
 M K L C S L A V L V P I V L F C E Q H V F A 22
 84 TTC CAG AGT GGC CAA GTT CTA GCT GCT CTT CCT AGA ACC TCT AGG CAA GTT CAA GTT CTA CAG AAT
 F Q S G Q V L A A L P R T S R Q V Q V L Q N 44
 150 CTT ACT ACA ACA TAT GAG ATT GTT CTC TGG CAG CCG GTA ACA GCT GAC CTT ATT GTG AAG AAA AAA
 L T T T Y E I V L W Q P V T A D L I V K K K 66
 216 CAA GTC CAT TTT TTT GTA AAT GCA TCT GAT GTC GAC AAT GTG AAA GCC CAT TTA AAT GTG AGC GGA
 Q V H F F V N A S D V D N V K A H L N V S G 88
 282 ATT CCA TGC AGT GTC TTG CTG GCA GAC GTG GAA GAT CTT ATT CAA CAG CAG ATT TCC AAC GAC ACA
 I P C S V L L A D V E D L I Q Q Q I S N D T 110
 348 GTC AGC CCC CGA GCC TCC GCA TCG TAC TAT GAA CAG TAT CAC TCA CTA AAT GAA ATC TAT TCT TGG
 V S P R A S A S Y Y E Q Y H S L N E I Y S W 132
 414 ATA GAA TTT ATA ACT GAG AGG CAT CCT GAT ATG CTT ACA AAA ATC CAC ATT GGA TCC TCA TTT GAG
 I E F I T E R H P D M L T K I H I G S S F E 154
 480 AAG TAC CCA CTC TAT GTT TTA AAG GTT TCT GGA AAA GAA CAA ACA GCC AAA AAT GCC ATA TGG ATT
 K Y P L Y V L K V S G K E Q T A K N A I W I 176
 546 GAC TGT GGA ATC CAT GCC AGA GAA TGG ATC TCT CCT GCT TTC TGC TTG TGG TTC ATA GGC CAT AAT
 D C G I (H) A (R) (E) W I S P A F C L W F I G H N 198
 612 CGA ATG TGG AGA AAG AAC CGT TCT TTC TAT GCG AAC AAT CAT TGC ATC GGA ACA GAC CTG AAT AGC
 R M W R K (N) (R) S F Y A N N H C I G T D L N (R) 220
 678 AAC TTT GTC TCC AAA CAC TGG TGT GAG GAA GGT GCA TCC AGT TCC TCA TGC TCG GAA ACC TAC TGT
 N F A S K H W C E E G A S S S S C S E T Y C 242
 744 GGA CTT TAT CCT GAG TCA GAA CCA GAA GTG AAG GCA GTG GCT AGT TTC TTG AGA AGA AAT ATC AAC
 G L Y P E S E P E V K A V A S F L R R N I N 264
 810 CAG ATT AAA GCA TAC ATC AGC ATG CAT TCA TAC TCC CAG CAT ATA GTG TTT CCA TAT TCC TAT ACA
 Q I K A Y I S M (H) (S) (Y) S Q H I V F P Y S Y T 286
 876 CGA AGT AAA AGC AAA GAC CAT GAG GAA CTG TCT CTA GTA GCC AGT GAA GCA GTT CGT GCT ATT GAC
 R S K S K D H E E L S L V A S E A V R A I E 308
 942 AAA ACT AGT AAA AAT ACC AGG TAT ACA CAT GGC CAT GGC TCA GAA ACC TTA TAC CTA GCT CCT GGA
 K T S K N T R Y T H G H G S E T L (Y) L A P G 330
 1008 GGT GGG GAC GAT TGG ATC TAT GAT TTG GGC ATC AAA TAT TCG TTT ACA TCA AAC CCA CCT GTA GAG
 G G (D) D W I Y D L G I K Y S F T S N P P V E 352
 1074 AAG CTT TTG CCG CTG TCT CTA AAA TAG ctggcatgtcattaggaatgtttaatgccccctgattttatcattctgctt
 K L L P L S L K 360
 1152 ccgtattttaatttactgattccagcaagaccaatcattgtatcagattatttttaagtitttatccgtagttttgataaaagattt
 1239 tcctatttccttggttctgtcagagaacctaaagtctactttgccattaaggcagactagggttcattgtctttttacccttttaa
 1326 aaaaaattgtaaaaagtctagttacctaacttttttttatttttcgacgtttgactagccatctcaagcaacttttcgacgtttgacta
 1413 gccatctcaagcaagtttaatacaagatcatctcagcgatcattggatcctactcaacaanaggaagggtgttcagaagtacatt
 1500 aaagatttctgtccaaattttcaataaattttcttcttctcttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

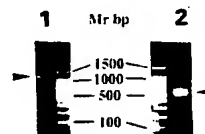
4 / 10

図 4

**B**

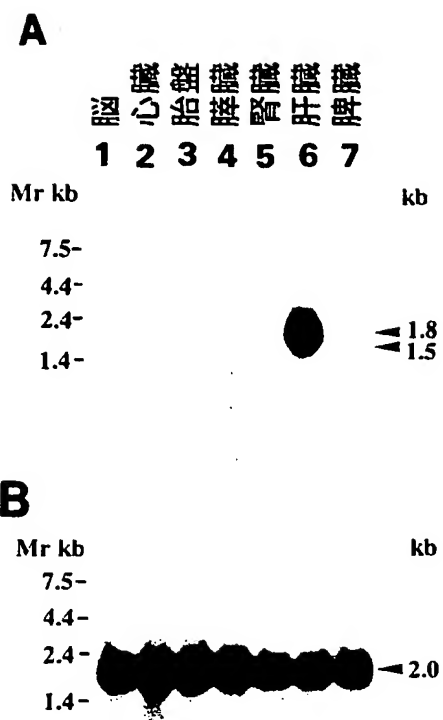
HBCPB2(347-360)
 atpSr(181-194)
 atpSo(182-195)
 atpC1(182-195)
 atpC2(183-196)

S	N	P	P	V	E	K	L	L	P	L	S	L	K	C末端
S	N	P	T	I	G	T	L	L	P	L	S	P	M	
S	D	P	V	I	H	T	L	L	P	L	S	P	K	
S	E	P	V	I	H	T	L	L	P	L	S	P	K	
S	D	P	V	I	H	T	L	L	P	L	S	P	K	

C

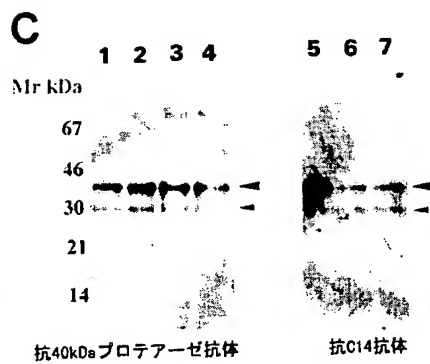
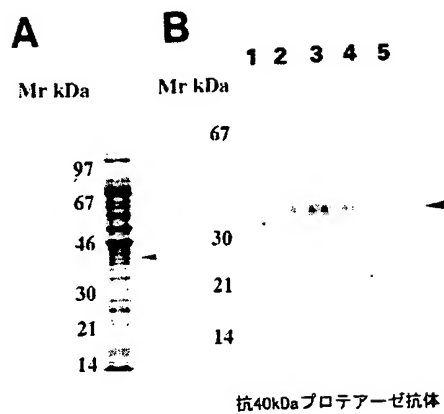
5 / 10

図 5



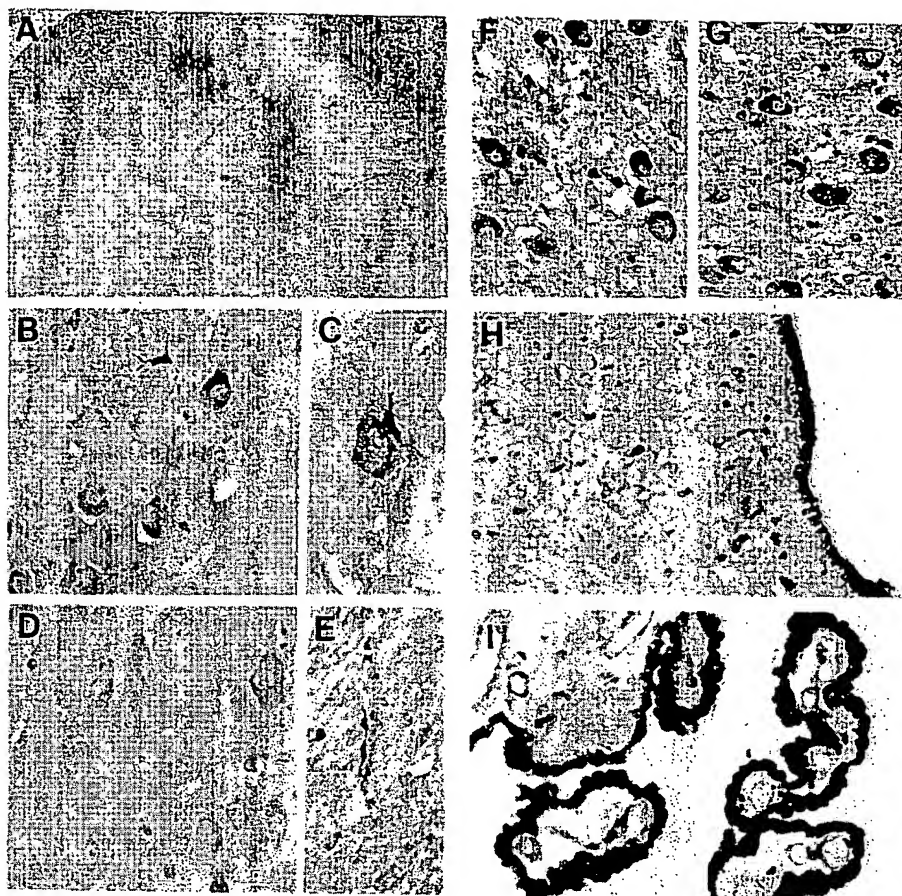
6 / 10

図 6



7 / 10

図 7



8/10

図 8

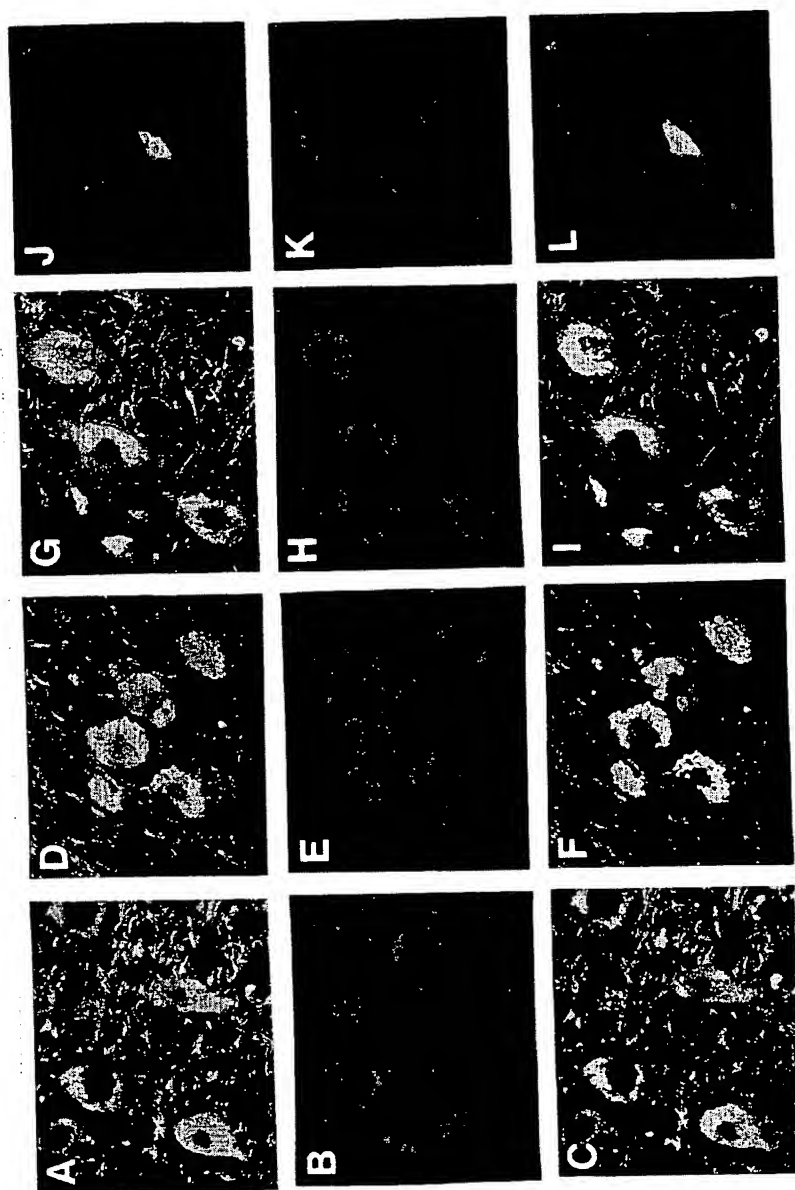
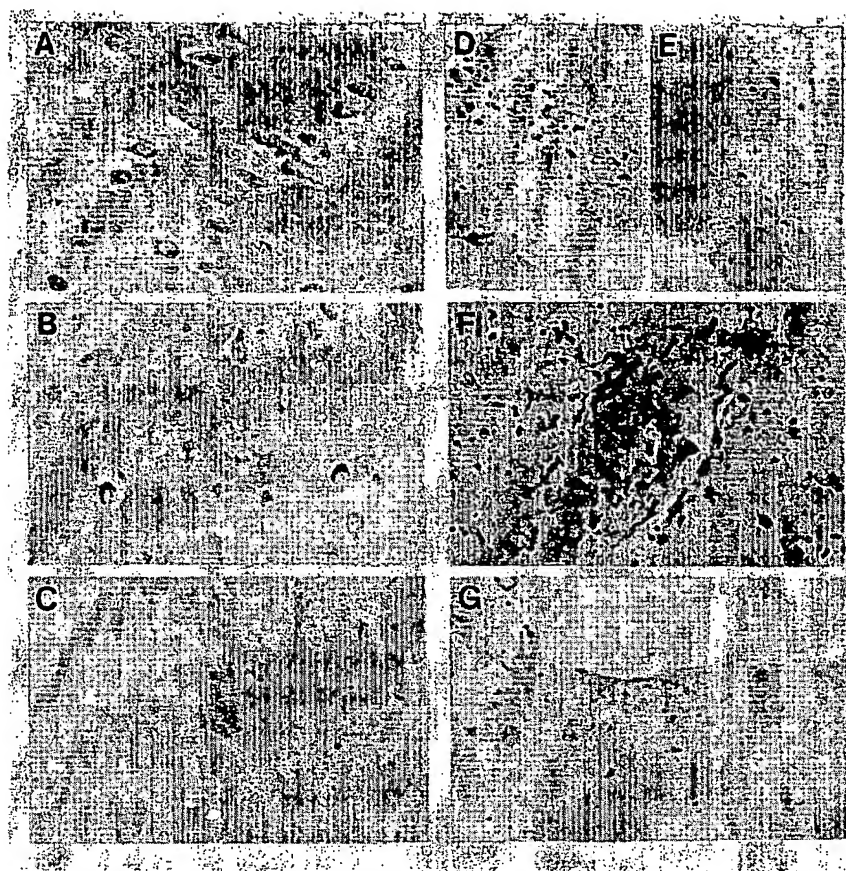
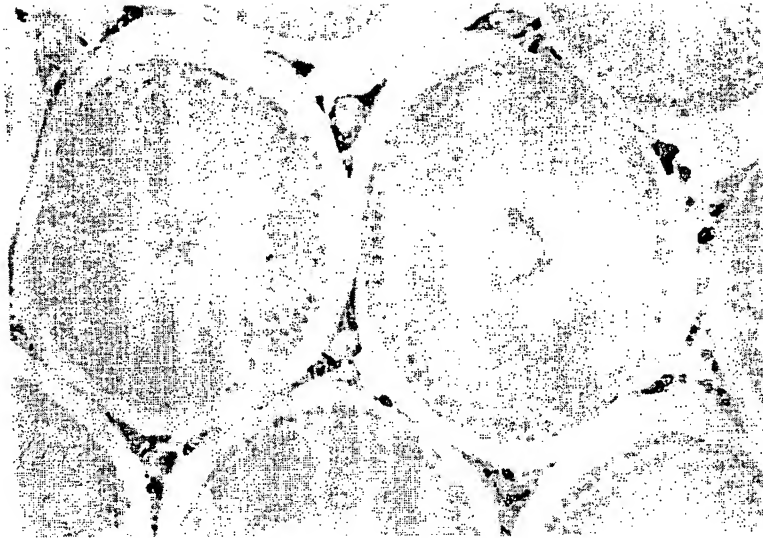


図 9



10/10

図 10



1/16

SEQUENCE LISTING

<110> AKIRA MATSUMOTO

<120> Human Brain Carboxypeptidase B

<130> MAT-101PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-125169

<151> 1999-04-30

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1573

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(1097)

2/16

<400> 1

agaaaattgc tgttggg atg aag ctt tgc agc ctt gca gtc ctt gta ccc 50

Met Lys Leu Cys Ser Leu Ala Val Leu Val Pro

1 5 10

att gtt ctc ttc tgt gag cag cat gtc ttc gcg ttc cag agt ggc caa 98

Ile Val Leu Phe Cys Glu Gln His Val Phe Ala Phe Gln Ser Gly Gln

15 20 25

gtt cta gct gct ctt cct aga acc tct agg caa gtt caa gtt cta cag 146

Val Leu Ala Ala Leu Pro Arg Thr Ser Arg Gln Val Gln Val Leu Gln

30 35 40

aat ctt act aca aca tat gag att gtt ctc tgg cag ccg gta aca gct 194

Asn Leu Thr Thr Thr Tyr Glu Ile Val Leu Trp Gln Pro Val Thr Ala

45 50 55

gac ctt att gtg aag aaa aaa caa gtc cat ttt ttt gta aat gca tct 242

Asp Leu Ile Val Lys Lys Lys Gln Val His Phe Phe Val Asn Ala Ser

60 65 70 75

gat gtc gac aat gtg aaa gcc cat tta aat gtg agc gga att cca tgc 290

Asp Val Asp Asn Val Lys Ala His Leu Asn Val Ser Gly Ile Pro Cys

80 85 90

3/16

agt gtc ttg ctg gca gac gtg gaa gat ctt att caa cag cag att tcc 338

Ser Val Leu Leu Ala Asp Val Glu Asp Leu Ile Gln Gln Gln Ile Ser

95

100

105

aac gac aca gtc agc ccc cga gcc tcc gca tcg tac tat gaa cag tat 386

Asn Asp Thr Val Ser Pro Arg Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr

110

115

120

cac tca cta aat gaa atc tat tct tgg ata gaa ttt ata act gag agg 434

His Ser Leu Asn Glu Ile Tyr Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg

125

130

135

cat cct gat atg ctt aca aaa atc cac att gga tcc tca ttt gag aag 482

His Pro Asp Met Leu Thr Lys Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys

140

145

150

155

tac cca ctc tat gtt tta aag gtt tct gga aaa gaa caa aca gcc aaa 530

Tyr Pro Leu Tyr Val Leu Lys Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys

160

165

170

aat gcc ata tgg att gac tgt gga atc cat gcc aga gaa tgg atc tct 578

Asn Ala Ile Trp Ile Asp Cys Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser

175

180

185

cct gct ttc tgc ttg tgg ttc ata ggc cat aat cga atg tgg aga aag 626

Pro Ala Phe Cys Leu Trp Phe Ile Gly His Asn Arg Met Trp Arg Lys

4/16

190	195	200	
aac cgt tct ttc tat gcg aac aat cat tgc atc gga aca gac ctg aat 674			
Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn			
205	210	215	
agc aac ttt gtc tcc aaa cac tgg tgt gag gaa ggt gca tcc agt tcc 722			
Ser Asn Phe Val Ser Lys His Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser			
220	225	230	235
tca tgc tcg gaa acc tac tgt gga ctt tat cct gag tca gaa cca gaa 770			
Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu			
240	245	250	
gtg aag gca gtg gct agt ttc ttg aga aga aat atc aac cag att aaa 818			
Val Lys Ala Val Ala Ser Phe Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys			
255	260	265	
gca tac atc agc atg cat tca tac tcc cag cat ata gtg ttt cca tat 866			
Ala Tyr Ile Ser Met His Ser Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr			
270	275	280	
tcc tat aca cga agt aaa agc aaa gac cat gag gaa ctg tct cta gta 914			
Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val			
285	290	295	

5/16

gcc agt gaa gca gtt cgt gct att gac aaa act agt aaa aat acc agg 962

Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala Ile Asp Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg

300 305 310 315

tat aca cat ggc cat ggc tca gaa acc tta tac cta gct cct gga ggt 1010

Tyr Thr His Gly His Gly Ser Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly

320 325 330

ggg gac gat tgg atc tat gat ttg ggc atc aaa tat tcg ttt aca tca 1058

Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ser

335 340 345

aac cca cct gta gag aag ctt ttg ccg ctg tct cta aaa tagcttgcca 1107

Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Lys

350 355 360

tgtcattagg aatgtttaat gccctgatt ttatcattct gcttcgatat ttaatttac 1167

tgattccagc aagaccaaatt cattgtatca gattatTTTT aagttttatc cgtagttttg 1227

ataaaagatt ttctattcc ttggttctgt cagagaacct aataagtgt actttgccaat 1287

taaggcagac tagggttcat gtctttttac cttttaaaaa aaaattgtaa aagtctagtt 1347

acctactttt tctttgattt tcgacgtttg actagccatc tcaagcaact ttcgacgttt 1407

6/16

gactagccat ctcaagcaag tttaatcaaa gatcatctca cgctgatcat tggatcctac 1467

tcaacaaaag gaagggtggt cagaagtaca tttaaagattt ctgctccaaa ttttcaataa 1527

atttcttctt ctccttttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1573

<210> 2

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Cys Ser Leu Ala Val Leu Val Pro Ile Val Leu Phe Cys

1 5 10 15

Glu Gln His Val Phe Ala Phe Gln Ser Gly Gln Val Leu Ala Ala Leu

20 25 30

Pro Arg Thr Ser Arg Gln Val Gln Val Leu Gln Asn Leu Thr Thr Thr

35 40 45

Tyr Glu Ile Val Leu Trp Gln Pro Val Thr Ala Asp Leu Ile Val Lys

50 55 60

Lys Lys Gln Val His Phe Phe Val Asn Ala Ser Asp Val Asp Asn Val

7/16

65 70 75 80

Lys Ala His Leu Asn Val Ser Gly Ile Pro Cys Ser Val Leu Leu Ala

85 90 95

Asp Val Glu Asp Leu Ile Gln Gln Gln Ile Ser Asn Asp Thr Val Ser

100 105 110

Pro Arg Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu

115 120 125

Ile Tyr Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu

130 135 140

Thr Lys Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val

145 150 155 160

Leu Lys Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile

165 170 175

Asp Cys Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu

180 185 190

Trp Phe Ile Gly His Asn Arg Met Trp Arg Lys Asn Arg Ser Phe Tyr

195 200 205

8/16

Ala Asn Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn Ser Asn Phe Val Ser

210

215

220

Lys His Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Ser Glu Thr

225

230

235

240

Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu Val Lys Ala Val Ala

245

250

255

Ser Phe Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys Ala Tyr Ile Ser Met

260

265

270

His Ser Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Thr Arg Ser

275

280

285

Lys Ser Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val Ala Ser Glu Ala Val

290

295

300

Arg Ala Ile Asp Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg Tyr Thr His Gly His

305

310

315

320

Gly Ser Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asp Asp Trp Ile

325

330

335

Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val Glu

340

345

350

9/16

Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Lys

355

360

<210> 3

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Gln Ser Gly Gln Val Leu Ala Ala Leu Pro Arg Thr Ser Arg Gln

1

5

10

15

Val Gln Val Leu Gln Asn Leu Thr Thr Thr Tyr Glu Ile Val Leu Trp

20

25

30

Gln Pro Val Thr Ala Asp Leu Ile Val Lys Lys Lys Gln Val His Phe

35

40

45

Phe Val Asn Ala Ser Asp Val Asp Asn Val Lys Ala His Leu Asn Val

50

55

60

Ser Gly Ile Pro Cys Ser Val Leu Leu Ala Asp Val Glu Asp Leu Ile

65

70

75

80

10/16

Gln Gln Gln Ile Ser Asn Asp Thr Val Ser Pro Arg Ala Ser Ala Ser

85

90

95

Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu Ile Tyr Ser Trp Ile Glu

100

105

110

Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu Thr Lys Ile His Ile Gly

115

120

125

Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val Leu Lys Val Ser Gly Lys

130

135

140

Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile Asp Cys Gly Ile His Ala

145

150

155

160

Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu Trp Phe Ile Gly His Asn

165

170

175

Arg Met Trp Arg Lys Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn Asn His Cys Ile

180

185

190

Gly Thr Asp Leu Asn Arg Asn Phe Ala Ser Lys His Trp Cys Glu Glu

195

200

205

Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro

210

215

220

11/16

Glu Ser Glu Pro Glu Val Lys Ala Val Ala Ser Phe Leu Arg Arg Asn
225 230 235 240

Ile Asn Gln Ile Lys Ala Tyr Ile Ser Met His Ser Tyr Ser Gln His
 245 250 255

Ile Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser Lys Asp His Glu
 260 265 270

Glu Leu Ser Leu Val Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala Ile Glu Lys Thr
 275 280 285

Ser Lys Asn Thr Arg Tyr Thr His Gly His Gly Ser Glu Thr Leu Tyr
 290 295 300

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp Leu Gly Ile Lys
305 310 315 320

Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu Leu Pro Leu Ser
 325 330 335

Leu Lys

12/16

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu Ile Tyr

1

5

10

15

Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu Thr Lys

20

25

30

Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val Leu Lys

35

40

45

Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile Asp Cys

50

55

60

Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu Trp Phe

65

70

75

80

Ile Gly His Asn Arg Met Trp Arg Lys Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn

85

90

95

Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn Arg Asn Phe Ala Ser Lys His

100

105

110

13/16

Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys
115 120 125

Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu Val Lys Ala Val Ala Ser Phe
130 135 140

Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys Ala Tyr Ile Ser Met His Ser
145 150 155 160

Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser
165 170 175

Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg Tyr Thr His Gly His Gly Ser
195 200 205

Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp
210 215 220

Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu
225 230 235 240

Leu Pro Leu Ser Leu Lys

14/16

245

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized oligopeptide sequence

<400> 5

Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu

1

5

10

15

Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu

20

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15/16

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

gcctccgcat cgtactatga acagtatcac

30

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

ggttcataagg ccataatcga atgt

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

16/16

synthesized primer sequence

<400> 8

tcaggggcat taaacattcc taat

24

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized oligopeptide sequence

<400> 9

Ser Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Lys

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/48-9/76, 15/00-15/90, 1/10-1/21, 5/10-5/28, C07K 16/40, C12P 21/00-21/02, C12Q 1/34-1/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICST FILE (JOIS), CA (STN),
REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MATSUMOTO, A. et al. "A novel carboxypeptidase B that processes native beta-amyloid precursor protein is present in human hippocampus", Eur. J. Neurosci (January, 2000) Vol.12, No.1, pp.227-238	1-26, 30, 31
X	EATON, D. L. et al. "Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma", J. Biol. Chem. (November, 1991) Vol.266, No.32, pp.21833-21838	10
X	SHIOI, J. et al. "Chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer's beta-amyloid precursor", J. Biol. Chem. (July, 1992) Vol.267, No.20, pp.13819-13822	12, 13
X	KANG, J. et al. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor", Nature (February, 1987) Vol.325, No.6106, pp.733-736	12, 13
X	MATSUMOTO, A. et al. "A human brain proteolytic activity capable of cleaving natural beta-amyloid precursor protein is affected by its substrate glycoconjugates." Neurosci. Lett. (February, 1998) Vol.242, No.2,	16, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 May, 2000 (29.05.00)

Date of mailing of the international search report
06 June, 2000 (06.06.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02878

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	pp.109-113	
A	TAN, A. K. et al. "Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma", Biochemistry (May, 1995) Vol.34, No.17, pp.5811-5816	1-26,30,31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Aberrant proteolysis of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells", Eur. J. Biochem. (October, 1993) Vol.217, No.1, pp.21-27	1-26,30,31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells", Biochem. Biophys. Res. Commun. (March, 1991) Vol.175, No.2, pp.361-365	1-26,30,31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02878

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 27-29 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02878

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37,
A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/48-9/76, 15/00-15/90, 1/10-1/21, 5/10-5/28, C07K 16/40, C12P 21/00-21/02, C12Q 1/34-1/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル (JOIS), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	MATSUMOTO, A. et al. "A novel carboxypeptidase B that processes native beta-amyloid precursor protein is present in human hippocampus.", Eur. J. Neurosci. (2000, Jan.) Vol. 12, No. 1, p. 227-238	1-26, 30, 31
X	EATON, D. L. et al. "Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma.", J. Biol. Chem. (1991, Nov.) Vol. 266, No. 32, p. 21833-21838	10
X	SHIOI, J. et al. "Chondroitin sulfate proteoglycan form of the	12, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.05.00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Alzheimer's beta-amyloid precursor. ", J. Biol. Chem. (1992, Jul.) Vol. 267, No. 20, p. 13819-13822	
X	KANG, J. et al. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. ", Nature (1987, Feb.) Vol. 325, No. 6106, p. 733-736	12, 13
X	MATSUMOTO, A. et al. "A human brain proteolytic activity capable of cleaving natural beta-amyloid precursor protein is affected by its substrate glycoconjugates. ", Neurosci. Lett. (1998, Feb.) Vol. 242, No. 2, p. 109-113	16, 17
A	TAN, A. K. et al. "Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma. ", Biochemistry (1995, May) Vol. 34, No. 17, p. 5811-5816	1-26, 30, 31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Aberrant proteolysis of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells. ", Eur. J. Biochem. (1993, Oct.) Vol. 217, No. 1, p. 21-27	1-26, 30, 31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells. ", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991, Mar.) Vol. 175, No. 2, p. 361-365	1-26, 30, 31

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)